# MECHANISMEN DER SIGNALTRANSDUKTION DURCH NEUROREZEPTOREN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans Peter Muhn
aus Nürnberg
1985

UNIV. LEIDEN BIBL.

# MECHANISMEN DER SIGNALTRANSDUKTION DURCH NEUROREZEPTOREN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans Peter Muhn

aus Nürnberg

1985

1. Referent: Prof. Dr. F. Hucho

2. Referent: Priv. Doz. Dr. J. Ahlers

Tag der mündlichen Prüfungen: 24./26.4.1985

Inhaltsverzeichnis


A Einleitung

1 Signalaufnahme und -verarbeitung durch Lebewesen 1

1.1 Kommunikation mit der Umwelt 1

1.2 Kommunikation zwischen Zellen und Organen höherer Lebewesen 1

1.3 Synapsen 2

1.3.1 Die chemische Synapse 2

1.3.2 Die neuromuskuläre Endplatte 4

1.4 Rezeptoren und ihre biochemischen Funktionen anhand zweier Beispiele 6

1.4.1 Definition und allgemeine Bedeutung von Rezeptoren 6

1.4.2 Prinzipien der Signalverarbeitung durch Rezeptoren 7

1.4.2.1 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor und sein Ionenkanal 8

1.4.2.1.1 Strukturelle Daten 8

1.4.2.1.2 Die Acetylcholin-Bindungsstelle und die Aktivierung des Ionenkanals 9

1.4.2.1.3 Der Ionenkanal und die Lokalanästhetika-Bindungsstelle 10

1.4.2.1.4 Funktionelle Zustände des nAChR 12

1.4.2.2. Der Beta-adrenerge Rezeptor und die Regulation der Adenylatcyclase-Aktivität 16

1.4.2.2.1 Liganden und Struktur der Beta-Rezeptoren 16

1.4.2.2.2 Bindung von Agonisten und Aktivierung der Adenylatcyclase 17

1.4.2.2.2.1 N-Proteine 17

1.4.2.2.2.2 Die Adenylatcyclase 19

1.4.2.2.2.3 Desensitivierung 19

2 Problemstellung 21

2.1 Identifizierung von Kanalkomponenten des nAChR 21

2.2 Anreicherung und Charakterisierung des zentralen Dopaminrezeptors in membrangebundenem Zustand 21

B Ergebnisse und Diskussion 23

1 Der Ionenkanal des nAChR 23

1.1 Vorbemerkungen 23

1.1.1 Das elektrische Organ von Torpedo: eine Rezeptorquelle 23
1.1.2 Lokalanästhetika und andere Ionenkanalblocker 23
1.2 Triphenylmethylphosphonium- Kanalligand und Photoaffinitätsreagenz des nAChR 27
1.2.1 Studien im Bindungsgleichgewicht 27
1.2.1.1 Charakterisierung der Photoreaktion 28
1.2.1.1.1 Zeitabhängigkeit der kovalenten ($^3$H)TPMP$^+$-Inkorporation 28
1.2.1.1.2 Aktionsspektrum der Photoreaktion 30
1.2.1.1.3 Selektivität und Speziesspezifität der Photoreaktion 32
1.2.1.1.4 Ausbeutebetrachtung 33
1.2.1.1.5 Bemerkungen 34
1.2.1.2 Agonisten und Antagonisten bewirken eine Verschiebung des Markierungsmusters der Rezeptor-Untereinheiten 35
1.2.1.2 Effekt nichtkompetitiver Antagonisten 39
1.2.1.3 Untersuchung der Wirkung von Alpha-Bungarotoxin 40
1.2.1.4 Einfluß von divalenten Kationen und Thiol-Reagenzien 45
1.2.1.5 Veränderung des Markierungsmusters durch Altern des Membranpräparats 46
1.2.2 Untersuchung der Kinetik der agonioststimulierten Verschiebung des ($^3$H)TPMP$^+$-Markierungsmusters 47
1.2.2.1 Verfolgung der Kinetik bei geringer Agonisten-Konzentration 47
1.2.2.2 Auflösung der Photoreaktion in physiologischem Zeitmaßstab 48
1.2.2.2.1 Vorstellung der Methode 48
1.2.2.2.2 Zeitabhängigkeit der Photoreaktion zwischen ($^3$H)TPMP$^+$ und dem nAChR bei verschiedenen Rezeptorzuständen 49
1.3 Versuch der ($^3$H)TPMP$^+$-Markierung des nAChR aus Rattenmuskel 54
1.4 Trialkyloxoniumionen als potentielle Kanalliganden des nAChR 56

1.4.1 Hintergrund 56
1.4.2 Eigene Experimente 57
1.4.2.1 $^{22}Na^+$-Efflux aus $TMO^+$-behandelten Rezeptormembranen 57
1.4.2.2 Acetylcholinbindung an $TMO^+$-modifizierten Membranen 58
1.4.2.3 ($^3H$)$TPMP^+$-Bindung an $TEO^+$-modifizierten Membranen 58
1.5 Diskussion der Ergebnisse 61

2 Dopaminrezeptoren im Zentralnervensystem höherer Säuger 69
2.1 Einführung 69
2.1.1 Lokalisierung dopaminerger Bahnen und ihre möglichen Funktionen 69
2.1.1.1 Das Tuberoinfundibularsystem 69
2.1.1.2 Das nigrostriatale System 69
2.1.1.3 Das mesocorticale System 70
2.1.2 Multiple Dopaminrezeptoren 71
2.1.2.1 Der $D_1$-Rezeptor und die Stimulierung der Adenylatcyclase 73
2.1.2.2 Der $D_2$-Rezeptor 73
2.1.2.2.1 $D_2$-Rezeptoren in der Hypophyse 75
2.1.2.2.2 $D_2$-Rezeptoren im Striatum 76
2.1.3 Anatomische Lokalisierung zentraler Dopamin-Rezeptoren 77
2.2 Ergebnisse 78
2.2.1 Präparation und teilweise Charakterisierung dopaminrezeptorhaltiger Membranen aus Säuger-Striatum 78
2.2.1.1 Gewebshomogenisation in hypotonem und isotonem Medium 78
2.2.1.2 Vergleich der Rezeptordichte in Rinder- und Schweinestriatum 78
2.2.1.4 Einige Bemerkungen 80
2.2.2 ($^3H$)Spiroperidol-Bindungsstudien 82
2.2.2.1 Zeitabhängigkeit der Bindung an Membranen aus Rinder- und Schweine- Nucleus caudatus 82

2.2.2.2 Scatchard-Analyse der Bindungsdaten 83
2.2.2.3 Untersuchung der Effekte von Kationen und Calmodulin 84
2.3 Versuche zur Photomarkierung von Dopaminrezeptoren 86
2.4 Nachweis von N-Protein in Membranen aus Schweine-Nucleus caudatus 87
2.5 Ausblick 89

3 Zusammenfassung 90

C Materialien, Geräte, Methoden 93
1 Materialien, Geräte 93
2 Methoden 98
2.1 Präparation AChR-reicher Membranen aus Torpedo-Electroplaques 98
2.2 Präparation DAR-haltiger Membranen aus Striatum vom Rind oder Schwein 99
2.3 Bindungsstudien 100
2.3.1 ($^3$H)ACh-Bindung an $TMO^+$-modifizierten Rezeptormembranen 100
2.3.2 ($^3$H)$TPMP^+$-Bindung an $TMO^+$-modifizierten Rezeptor membranen 101
2.3.3 ($^3$H)Spi-Bindung an Striatummembranen 102
2.4 Photomarkierungsexperimente 102
2.4.1 ($^3$H($TPMP^+$-Markierung des nAChR aus Torpedo im Bindungsgleichgewicht 102
2.4.2 Versuch der ($^3$H)$TPMP^+$-Markierung des nAChR aus Rattenmuskel 103
2.4.3 Aufnahme eines Aktionsspektrums der Photoreaktion zwischen ($^3$H)$TPMP^+$ und nAChR aus Torpedo 104
2.4.4 Photomarkierung im Millisekundenmaßstab 105
2.4.5 Versuche zur Photomarkierung des $D_2$-Rezeptors 106
2.5 SDS-Elektrophoresen 106
2.6 Proteinbestimmung 106
2.7 Nachweis von Phospholipase-Aktivität in kommerziellen BTX-Präparaten 106

2.8 $^{22}Na^{+}$-Efflux aus nAChR-reichen Torpedo-Membranen 107
2.9 ADP-Ribosylierung durch Cholera- bzw. Pertussis-Toxin 107

D Literatur 109

E Anhang 117
1 Abkürzungen 117
2 Weitere Experimente 119

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549615_0014

Die vorliegende Arbeit wurde bei Prof. Dr. F. Hucho im Institut für Biochemie, Fachbereich Chemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Teilergebnisse sind veröffentlicht:

Muhn, P., Hucho, F. (1983). Covalent Labeling of the Acetylcholine Receptor from Torpedo Electric Tissue with the Channel Blocker ($^3$H)Triphenylmethylphosphonium by Ultraviolet Irradiation. Biochemistry 22, 421-425.

Muhn,P., Lauffer, L., Hucho, F. (1983). The Acetyl choline Receptor and its Ion Channel; in: "Mobility and Recognition in Cell Biology", Hrsg. Sund, H., Veeger, C., de Gruyter,Berlin, 393-407.

Muhn, P., Lauffer, L., Hucho, F. (1983). Photolabeling of Acetylcholine Receptor States with Triphenyl-methylphosphonium; in: "Toxins as Tools in Neuro-chemistry", Hrsg. Hucho, F., Ovchinnikov, Yu., de Gruyter, Berlin, 235-244.

Muhn, P., Fahr, A., Hucho, F. (1984). Photoaffinity Labeling of Acetylcholine Receptor in Millisecond Time Scale. FEBS Lett. 166, 146-150.

Muhn, P., Fahr, A., Hucho, F. (1984). Rapid Laser Flash Photoaffinity Labeling of Binding Sites for a Noncompetetive Inhibitor of the Acetylcholine Receptor. Biochemistry 23, 2725-2730.

# A Einleitung

## 1 Signalaufnahme und -verarbeitung durch Lebewesen

Eine der zentralen Bedingungen des Lebens stellt die Fähigkeit zur Reaktion auf sich ändernde Umweltbedingungen dar. Hierzu wurden im Lauf der Evolution kommunikative Systeme entwickelt, welche die Erkennung und Verarbeitung von Reizen vermitteln und eine adäquate Folgereaktion auszulösen helfen. - Einige dieser Systeme sollen kurz vorgestellt werden.

### 1.1 Kommunikation mit der Umwelt

Schon einzellige Lebewesen besitzen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, welche bestimmte im Medium befindliche Moleküle "erkennen" können. - Oft reagiert die Zelle mit der Wanderung entlang des Konzentrationsgradienten des Reizstoffes; dieser Prozess wird Chemotaxis genannt. Bakterien können sich chemotaktisch zur Nahrungsquelle begeben. Dictyostelium discoideum bildet bei Nahrungsmangel vielzellige Aggregate, wobei die Einzelzellen cAMP als chemotaktischen Reizstoff ins Medium abgeben. Die Zellaggregate sichern durch Bildung von Sporen das Überleben in der Mangelsituation. - Die genauen Mechanismen der Signalverarbeitung und Aktivierung des Fortbewegungsapparates sind unbekannt.

### 1.2 Kommunikation zwischen Zellen und Organen höherer Lebewesen

Die Existenz vielzelliger Organismen ist an die Entwicklung komplexerer Kommunikationssysteme gebunden: Umweltreize können nicht auf alle Zellen gleichermassen einwirken; nur an der Oberfläche finden sich Reiz-Rezeptoren. Infolgedessen tritt als neues Problem die Organisation und Koordination der vielen Milliarden von Einzelzellen auf.
Diese Aufgaben werden von Hormon- und Nervensystem erfüllt, die ihrerseits in enger Verbindung miteinander stehen.

Hormone werden in bestimmten Zelltypen bzw. Organen gebildet und an die Blutbahn oder die Interstitialflüssig-

keit (Gewebshormone) abgegeben, von wo aus sie zur Zielzelle diffundieren und dort von spezifischen Membranproteinen, den Hormonrezeptoren, gebunden werden. Ausnahmen bilden Steroidhormone und Trijodthyronin, deren Rezeptoren sich im Cytoplasma der Erfolgszellen befinden. - Die Folgereaktionen dienen häufig der Anpassung des Stoffwechsels an die jeweilige Lebenssituation, wobei Induktion bzw. Regulation bestimmter Enzyme von besonderer Bedeutung sind.

Schon früh in der Evolution kam es neben der Ausformung des humoralen zur Entwicklung eines Nervensystems. Jenem gegenüber besitzt dieses den Vorteil schnellerer Reizübertragung über weitere Strecken. Gravierender noch ist die relativ grössere Flexibilität des Nervensystems. Ist die humorale Reizantwort immer stereotyp, flexibel nur in der Quantität, so befähigt ein entwickeltes Nervensystem zu qualitativ unterschiedlichen Reaktionen, bis hin zur bewussten Wahrnehmung und Entscheidung des menschlichen Gehirns. Der Grund hierfür liegt in der Integration excitatorischer und inhibitorischer Signale in einem komplizierten Netzwerk von Milliarden Neuronen; ihr Zusammenwirken ist noch weitgehend unverstanden.

Grundbaustein des Nervensystems ist die Ganglienzelle (Neuron); der Zellkörper (Soma) trägt Dendriten, welche Impulse zum Soma hinleiten, und Axonen, welche Impulse wegleiten. - Das Axon endet in einer Kontaktstelle zum nächsten Neuron, der Synapse; präsynaptisch ausgeschütteter Neurotransmitter diffundiert durch den synaptischen Spalt, wird von Neurotransmitter-Rezeptoren, postsynaptischen integralen Membranproteinen, gebunden, wodurch dann ein bestimmtes Folgeereignis, zum Beispiel ein Aktionspotential, ausgelöst wird.

Die ionalen Grundlagen und Membraneigenschaften, welche das Zustandekommen des Ruhepotentials von etwa -7o mV (innen negativ gegen aussen) und dessen schlagartige Änderung, des Aktionspotentials, bewirken, sind in Lehrbüchern der Neurochemie ausführlich dargestellt (1). - Die Signalverarbeitung durch Rezeptoren soll anhand zweier Beispiele beschrieben werden (s.1.4). Hierzu jedoch ist eine kurze Darstellung des Baus und der Funktion von Synapsen notwendig.

## 1.3 Synapsen

Das Axon endet in einer Kontaktstelle zum nächsten Neuron, der Synapse. - Bei der elektrischen Synapse wird das Aktionspotential direkt auf die nächste Zelle weitergeleitet; ihre Funktion und Bedeutung ist unklar. Meist jedoch erfolgt die synaptische Reizübertragung auf chemischem Wege.

## 1.4 Die chemische Synapse

Sie besteht aus einem prä- und einem postsynaptischen spezialisierten Membranbereich, getrennt durch den synaptischen Spalt von 2o - 4o nm Breite, welcher vermutlich von einer Basallamina gefüllt ist. - Diese Distanz ist für die direkte elektrische Signalübertragung zu gross; das Aktionspotential verebbt also im Spalt. Präsynaptisch jedoch wird durch das Eintreffen des Aktionspotentials Neurotransmitter freigesetzt, eine Substanz, die durch den synaptischen Spalt diffundiert und durch Bindung an Rezeptoren das Signal auf die postsynaptische Stelle überträgt.

Eine Synapse leitet demnach nur unidirektional, sie hat Gleichrichterfunktion. - Während im peripheren Nervensystem höherer Vertebraten Acetylcholin und Catecholamine vorherrschende Neurotransmitter sind, finden sich im ZNS eine Vielzahl von Überträgern, wie GABA, Glycin und andere Aminosäuren, aber auch Peptide wie Enkephaline, Substanz P und andere Stoffe.

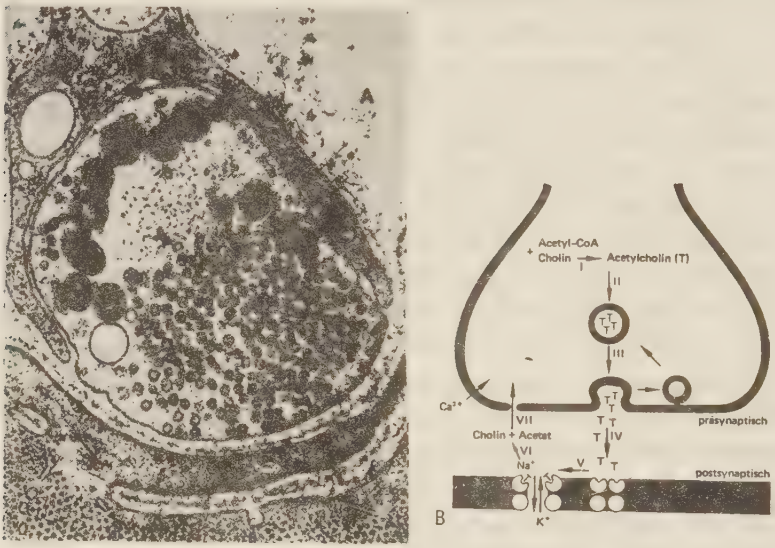
Man unterscheidet excitatorische und inhibitorische Synapsen. Bei den erstgenannten führt die präsynaptische Transmitterfreisetzung zur postsynaptischen Depolarisierung (EPSP) durch Öffnung von $Na^+$-, $K^+$- und $Cl^-$-Kanälen. Typischer Transmitter ist Glutamat. Der bekannteste inhibitorische Transmitter ist GABA; er führt durch postsynaptische Öffnung von $Cl^-$-Kanälen zur Hyperpolarisierung der Membran bis auf -9o mV (IPSP).

Während Grundstruktur und Funktion der Synapsen ähnlich sind, ergeben sich im Detail beträchtliche Unterschiede. Erwähnt werden sollen besonders die monoaminergen Synapsen, sogenannte Varikositäten. Sie erscheinen im Elektronenmikroskop weniger kompakt, mit geringerer postsynaptischer

Rezeptordichte als die nikotinisch cholinerge Synapse (s.1.3.2), welche im folgenden näher vorgestellt werden soll.

### 1.3.2 Die neuromuskuläre Endplatte

Dieser Synapsentyp bildet die Verbindung zwischen der Muskelzellmembran und dem erregenden Nerv (Fig.1).




C: $CH_3-N^+(CH_3)_2-CH_2-CH_2-OH + CH_3-CO-SCoA \xrightarrow{ChAT} CH_3-N^+(CH_3)_2-CH_2-CH_2-O-CO-CH_3 + CoASH$

Fig. 1 Die nikotinisch-cholinerge Synapse.
A: elektronenmikroskopische Aufnahme einer Nerv-Muskel-Verbindung (aus (2)).
B: schematische Darstellung (aus (1)). I-VII: Schritte des Transmitterkreislaufs (s. Text).
C: Synthese von Acetylcholin (ChAT: Cholinacetyltransferase).

Elektronenmikroskopisch erkennt man in der präsynaptischen Endigung eine Ansammlung von Vesikeln, Mitochondrien und Granula. Die biochemische Charakterisierung gelang durch Präparation von Synaptosomen (3). Hierbei handelt es sich um präsynaptische Membranabschnürungen, meist mit anhaftender postsynaptischer Membran. - Am besten untersucht ist die neuromuskuläre Endplatte des Zitterrochens Torpedo. Der Neurotransmitter Acetylcholin wird durch Cholin-Acetyltransferase aus Cholin und Acetyl-CoA synthetisiert (Fig.1C) und in die präsynaptischen Vesikel verpackt; jedes enthält ca. 1o ooo Moleküle Acetylcholin, daneben grosse Mengen ATP. - Das eintreffende Aktionspotential bewirkt die Öffnung potentialabhängiger $Ca^{2+}$-Kanäle; $Ca^{2+}$-Einstrom führt zur Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran und Abgabe ihres Inhalts in den synaptischen Spalt. - Die Vesikelhypothese ist nicht unumstritten; zweifellos allerdings erfolgt die Transmitterfreisetzung in Quanten (4).

Bindung von Acetylcholin an den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR), der in hoher Dichte auf der postsynaptischen Membran lokalisiert ist, löst die Öffnung seines Kationenkanals aus (s.1.4.2). Werden nur wenige Quanten Acetylcholin freigesetzt, entsteht ein Miniaturendplattenpotential (m.e.p.p.); die Summe vieler m.e.p.p.'s bildet das excitatorische postsynaptische Potential (e.p.s.p.).

Beim Skelettmuskel breitet sich die Erregung über die transversen Tubuli aus und führt zur $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, Aktivierung der Myosin-ATPase und Aktin-Myosin-Kopplung, dem Mikroereignis der Muskelkontraktion. Das elektrische Organ von Torpedo entlädt sich allein durch Depolarisieung der postsynaptischen Membran. - Die Inaktivierung des Neurotransmitters wird durch Abdissoziation vom Rezeptor und anschliessende enzymatische Hydrolyse durch Acetylcholinesterase besorgt (5). Dieses Enzym ist mit seinem Kollagenschwanz vermutlich in der synaptischen Basallamina verankert. - Offensichtlich wird

präsynaptisch so viel Acetylcholin freigesetzt, dass die Esterase abgesättigt ist, ein Teil aber die postsynaptische Membran erreicht. Cholin wird über einen Carrier in der präsynaptischen Membran wiederaufgenommen.

## 1.4 Rezeptoren und ihre biochemischen Funktionen anhand zweier Beispiele

1.4.1 Definition und allgemeine Bedeutung von Rezeptoren. Unter einem Rezeptor versteht man den primären Wirkort eintreffender Reize. Demnach können umgekehrt nur solche Reize wahrgenommen werden, für die im Laufe der Evolution Rezeptoren entwickelt wurden.

Entsprechend der Verschiedenartigkeit zu verarbeitender Signale tragen sehr unterschiedliche Sensoren die Bezeichnung "Rezeptor". Der Neurochemiker verwendet allgemein den molekularen Rezeptorbegriff. Er meint Membranproteine, die endogene Liganden spezifisch, oft hochaffin binden, und die nur in bestimmten Geweben lokalisiert sind. Die Bindungsstellen sind sättigbar, d.h. in begrenzter Anzahl vorhanden. Unter Neurotransmitterrezeptoren versteht man meist Proteine der postsynaptischen Membran. Sie stellen den primären Wirkort des freigesetzten Neurotransmitters dar, dessen Bindung z.B. die Ionenpermeabilitätsveränderung der postsynaptischen Membran auslöst. - Daneben wird der Rezeptorbegriff auch für ganze Zellaggregate, die Sinnesrezeptoren, z.B. die Tastkörperchen oder die Photorezeptoren der Retina, verwendet.

Was ist der Sinn von Rezeptormolekülen? Oft löst nicht der Reiz selbst intrazelluläre Prozesse aus, sondern ein "second messenger", der rezeptorvermittelt freigesetzt wird, wie z.B. cAMP, cGMP, $Ca^{2+}$, Inositolphosphate.

Warum dieser Umweg? Viele Hormone liegen physiologisch in extrem niedrigen Konzentrationen vor; ausserdem sind die meisten kaum membrangängig; Aktionspotentiale stellen im Zellinneren kein erkennbares Signal dar. Rezeptoren machen äussere Signale für die Zelle erkennbar und verstärken sie zugleich.

1.4.2 Prinzipien der Signalverarbeitung durch Rezeptoren. Die Bindung des Agonisten an den Rezeptor löst ein Folgesignal aus; Antagonisten kompetieren mit Agonisten um dieselbe Bindungsstelle, bewirken aber keine physiolosche Antwort. - Entsprechend des signalverarbeitenden Prinzips lassen sich zwei Rezeptorklassen unterscheiden: ionenkanalregulierende und enzymregulierende. Bekanntester ionenkanalassoziierter Rezeptor ist der nAChR; als typische Vertreter der zweiten Klasse können beta-adrenerge Rezeptoren gelten.

Der Kationenkanal des nAChR ist integraler Bestandteil des Rezeptorkomplexes selbst (9). Dies scheint auch für andere ionenkanalassoziierte Rezeptoren zu gelten. Der nAChR ist über ein Polypeptid vom Molekulargewicht 43 KD (alpha') fest in der postsynaptischen Membran verankert; alpha' kann durch pH 11-Extraktion entfernt werden, ohne dass die Rezeptorfunktionen beeinflusst werden (6). Jedoch erhöht sich die Beweglichkeit des Rezeptors in der Membran sehr stark.

Der beta-adrenerge Rezeptor reguliert die Aktivität der Adenylatcyclase; Bindung von Agonisten führt zur Stimulierung des Enzyms. Auch andere Rezeptortypen steuern die Cyclaseaktivität; ihre Effekte sind jedoch nicht additiv, vielmehr scheinen die Rezeptoren um das Enzym zu konkurrieren. Umgekehrt regulieren z.B. der Insulin- oder alpha, -adrenerge Rezeptor mehrere Prozesse, obwohl jeweils nur ein Rezeptortyp existiert. - Diese Beobachtungen lassen sich nur dadurch erklären, dass diese Rezeptoren im Gegensatz zum nAChR Beweglichkeit in der Membran besitzen und nicht fest mit einem Erfolgsenzym assoziiert sind. Dies formulierte Cuatrecasas in seiner "floating receptor hypothesis" (7). - Neben der Adenylatcyclase existieren noch eine Reihe weiterer rezeptorregulierter Enzyme, z.B. die Guanylatcyclase, die Phosphodiesterase, Phospholipasen, verschiedene Transportsysteme und andere.

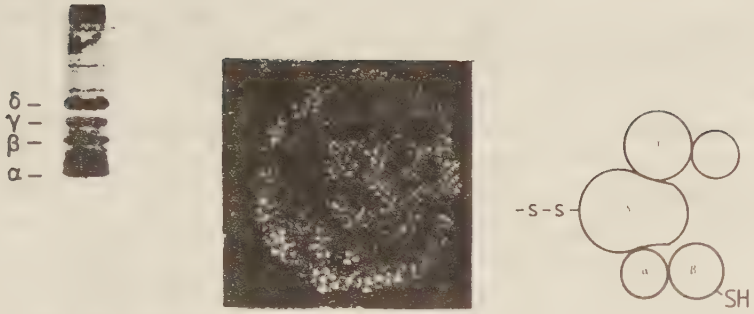
Struktur und biochemische Aktionsweise der beta-adrenergen Rezeptoren und des nAChR sollen nun beschrieben werden, soweit dies zum Verständnis der vorliegenden Arbeit notwendig ist.

### 1.4.2.1 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor und sein Ionenkanal

Dieser Neurorezeptor ist vergleichsweise am besten charakterisiert, da er ohne großen Aufwand milligrammweise aus dem elektrischen Organ von Torpedo oder Electrophorus ( Zitterrochen bzw. Zitteraal) isoliert und gereinigt werden kann. In diesem Gewebe bildet er bis zu 80% des Membranproteins. Diese Quelle wurde von Nachmansohn in den Fünfziger Jahren entdeckt und erforscht (8).-
Die Reinigung des nAChR aus Skelettmuskel oder dem ZNS ist nur affinitätschromatographisch möglich und nicht unproblematisch (10).-

#### 1.4.2.1.1 Strukturelle Daten

Der nAChR ist ein pentameres Membranprotein vom Molekulargewicht 270 kD. Die stark homologen Untereinheiten werden mit Alpha, Beta, Gamma, Delta bezeichnet; pro Pentamer liegen zwei Alpha-Untereinheiten vor. Der Komplex kann derzeit nur durch denaturierende Detergenzien wie SDS dissoziiert werden.-
Zwar wurde die Primärstruktur durch Sequenzanalyse der clonierten cDNA's aufgeklärt (11); die Molekulargewichtsangaben schwanken jedoch etwas, da alle Untereinheiten glykosyliert sind.-
Die Auswertung elektronenmikroskopischer Bilder ergab für den Gesamtkomplex einen Durchmesser von 80 Å; er ragt auf der externen Seite ca. 50 Å, auf der cytoplasmatischen ca. 15 Å aus der Membran heraus (12). Nach Negativkontrastierung findet man im Zentrum einer jeden Rosette eine elektronendichte Stelle (Fig. 2 B), die mit dem Ionenkanal in Verbindung gebracht wurde (13).-
Alle Untereinheiten durchspannen die Membran (9). Ihre Nachbarschaft konnte durch crosslink- Experimente bestimmt werden; aufgrund dieser Daten wurde eine hufeisenförmige Struktur des Pentamers postuliert (12, 14, Fig. 2C).




A B C

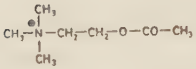
Fig. 2. Struktur des nAChR.- A: SDS-Elektropherogramm der Untereinheiten. B: elektronenmikroskopische Aufnahme rezeptorreicher Membranvesikel (aus (12)). C: Modell des nAChR (aus (14)).

Ähnliche Formen konnten im Elektronenmikroskop beobachtet werden (19; 15).- Der Rezeptor enthält ca. 7 Phosphatgruppen pro Molekül (16), außerdem komplex gebundenes $Ca^{2+}$.

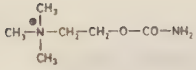
### 1.4.2.1.2 Die Acetylcholin-Bindungsstelle und die Aktivierung des Ionenkanals

Die zwei Alpha-Untereinheiten des nAChR wurden durch eine Vielzahl cholinerger Affinitätsreagenzien als Träger der beiden Agonistenbindungsstellen identifiziert (17). Diese unterscheiden sich geringfügig in ihrer Affinität, möglicherweise infolge unterschiedlicher Glykosylierung beider Alpha-Ketten (18).-
Die Bindung cholinerger Agonisten wie Acetylcholin (ACh), Carbamoylcholin (Carb) oder Nikotin führt zur Öffnung des Ionenkanals. Antagonisten sind die Alpha-Toxine bestimmter Schlangenvenome, d-Tubocurarin, Flaxedil und andere.

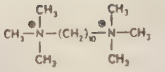
Agonisten



Acetylcholin



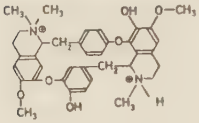
Carbamoylcholin



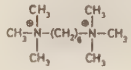
Decamethonium

Nikotin

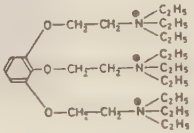
Antagonisten



d-Tubocurarin



Hexamethonium



Flaxedil

### 1.4.2.1.3 Der Ionenkanal und die Lokalanästhetika-Bindungsstelle

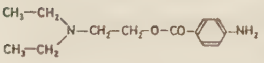
Die Alphaketten tragen die Bindungsstellen für cholinerge Liganden; die Funktionen der restlichen Untereinheiten sind unbekannt.- Zentrale Fragestellungen beschäftigen sich mit der Lokalisierung, Struktur und Funktion des Ionenkanals (Ionophors) (12).
Der Ionenkanal ist Bestandteil des Rezeptorkomplexes; dies konnte durch immunologische Studien (9), durch funktionelle Rekonstitution Detergens-solubilisierter, affinitätschromatographisch gereinigter Rezeptoren in Lipidmembranen (19, 20) und durch kovalente Modifikation des Rezeptorproteins durch Ionenkanalblocker und bestimmter Derivate abgesichert werden (9; 21, 22, 23).
Lokalanästhetika und andere Verbindungen, wie das Froschgift Histrionicotoxin (HTX), das Halluzinogen Phencyclidin (PCP) oder das lipophile Kation $TPMP^+$ können nämlich die Lokalanästhetika-Bindungsstelle des nAChR besetzen und dabei den Ionenkanal blockieren (24, 25, 26, 27, 28, 41).

Währendihre inhibierende Wirkung früher als rein allosterischer Effekt betrachtet wurde (9, 29), existieren heute Daten, die daneben direkte sterische Interaktionen zwischen diesen Verbindungen und dem Ionenkanal nahelegen (30). Sie wurden insbesondere durch elektrophysiologische Studien (31) und Einzelkanalmessungen (32) in Gegenwart von Kanalblockern gewonnen. Bei letzteren Untersuchungen beobachtete man, daß der "normale" Viereck-Strompuls durch ein Lidocain-Derivat in sehr viel kürzere Impulse "zerhackt" wurde. Dies kann am besten durch wiederholtes Binden des Blockers an den offenen Kanal erklärt werden (32). Nichtkompetitive Blocker stellen demnach interessante Sonden zur Untersuchung des Ionenkanals dar.-
Sehr wahrscheinlich wird der Kanal von allen Untereinheiten gemeinsam gebildet; dies legen Komplementierungstests durch in ovo-Expression untereinheitenspezifischer mRNA's nahe (33). Die Photomarkierung mehrerer Untereinheiten durch den Kanalblocker Chlorpromazin wurde ähnlich interpretiert (30).
Kanalmodelle postulieren eine derartige transmembranale Orientierung der stark homologen Untereinheiten, daß in ihrem Zentrum eine hydrophile Pore entsteht, welche die Ionentranslokation durch die Lipidphase ermöglichen soll (34, 35).-

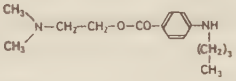
Das unterschiedliche Bindungsverhalten der Kanalblocker soll später eingehend dargestellt werden (s. B 1.1.2).-
Wichtige Charakteristika des Ionenkanals wurden im elektrophysiologischen Experiment bestimmt (9, 100).
Er ist weniger selektiv als axonale Ionenkanäle; einwertige Kationen permeieren etwa gleich, zweiwertige weniger gut. Für Anionen ist der Kanal impermeabel.
Er ist durch Protonen blockierbar; der zugehörige pK-Wert beträgt 4,8. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Carboxylgruppe, die an der Ionentranslokation durch den Kanal beteiligt sein könnte (s. auch Abschn. B 1.4).

Zumindest in der neuromuskulären Endplatte stellt die Kanalöffnung einen "Alles-oder-Nichts"-Prozeß dar, man beobachtet also nur voll leitende und geschlossene Zustände (32). Weitere Eigenschaften von Einzelkanälen sind im folgenden Abschnitt geschildert.

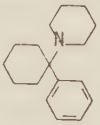
Kanalblocker



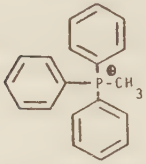
Procain



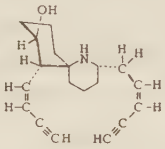
Tetracain



Phencyclidin (PCP)



Triphenylmethyl-phosphonium ($TPMP^+$)



Histrionicotoxin (HTX)

Kanalblockierende Eigenschaften besitzen auch verschiedene Detergenzien, Fettsäuren, allgemeine Anästhetika und andere Verbindungen (Details s. B 1.1.2).

### 1.4.2.1.4 Funktionelle Zustände des nAChR

Die dynamischen Eigenschaften des nAChR waren Gegenstand intensiver Untersuchungen.

Wie Messungen an Einzelkanälen zeigten, geht der Ionenkanal innerhalb von höchstens 20 µs nach Agonistenbindung vom ruhenden Zustand (R) in den aktivierten oder geöffneten Zustand (A) über, bleibt je nach Agonist 1-6 ms geöffnet und kehrt dann wieder in den Ruhezustand zurück (32). Daten über die Kinetik der Kanalöffnung liegen bislang nicht vor.

Andauernde Einwirkung von Agonisten führt ebenfalls zur Inaktivierung des Ionenkanals; damit gekoppelt ist der Abfall der Agonisten-Dissoziationskonstanten um zwei Größenordnungen, z.B. für ACh von $10^{-6}$ auf $10^{-8}$ M. Dieser Prozeß wird als Desensitivierung bezeichnet (9; 36). Bezüglich der desensitivierenden Wirkung von Antagonisten herrscht teilweise Unklarheit; lediglich die Rolle der Alpha-Toxine wird eindeutig beschrieben: sie binden nur an den R-Zustand und stabilisieren ihn damit (9; 36, 37).- Bestimmte Kanalblocker desensitivieren ebenfalls, ohne jedoch dabei mit der ACh-Bindungsstelle zu interagieren; sie gelten daher als allosterische Effektoren des nAChR (9; 29). Mit Ausnahme von HTX stabilisieren sie den D-Zustand in Abwesenheit von Agonisten, beschleunigen die Desensitivierung in deren Gegenwart (38, 39, 40). Umgekehrt steigern cholinerge Effektoren die Affinität des nAChR für bestimmte Kanalliganden (25, 27, 28, 41).-

Die Kinetik der Desensitivierung wurde mit verschiedenen Methoden gemessen. Zu nennen ist hier die Technik der Inhibierung der Anfangsbindungsgeschwindigkeit von Alpha-Toxinen durch Agonisten in Gegenwart bzw. Abwesenheit desensitivierender Effektoren (36). Mittlerweile stehen daneben direkte Meßtechniken mit wesentlich verbesserter zeitlicher Auflösung zur Verfügung (9; 42). In detaillierten Studien mit ACh wurde die Halbwertszeit der Desensitivierung zu 400 s bei $10^{-8}$ M ACh bis zu 0,4 s bei $5 \times 10^{-5}$ M ACh bestimmt (43). -

Die funktionellen Zustände des nAChR werden sehr wahrscheinlich durch Konformationsänderungen im Protein er-

reicht. Eine Reihe von Beobachtungen weisen in diese Richtung: spektroskopische Messungen wie der Fluoreszenzänderung von Tryptophanylresten (44), aber auch externer Reportergruppen, z.B. des Kanalblockers Quinacrin (40, 45) oder des gemischten Agonisten/nichtkompetetiven Antagonisten Dansyl-$C_6$-Cholin (38) nach Ligandenbindung an den Rezeptor. Biochemische Daten wie die unterschiedliche Reduzierbarkeit von Disulfidbrücken im R- bzw. D-Zustand (46) oder, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt, Photomarkierung unterschiedlicher Rezeptoruntereinheiten durch Kanalliganden in Gegenwart bzw. Abwesenheit cholinerger Effektoren, legen den gleichen Schluß nahe (20,21).-

Die Relaxationskinetik der Fluoreszenzänderung von Dansyl-$C_6$-Cholin nach Bindung an den nAChR ließ sich in drei Komponenten zerlegen; die schnellste war mit der Bindung des Fluorophors an einen im Gleichgewicht befindlichen, für Agonisten hochaffinen, d.h. desensitivierten, Anteil von Rezeptoren korrelierbar (ca. 20%). Die langsamste Relaxation war mit dem Prozeß der Desensitivierung korrelierbar. Eine intermediäre Relaxationskomponente wurde zunächst mit der Aktivierung des Ionenkanals in Verbindung gebracht (38). Diese Betrachtungsweise änderte sich jedoch (9), als bei Einzelkanalmessungen (47) und Ionenflußstudien an nAChR-haltigen Membranvesikeln (s. B 1.1.1) im Sekundenbereich (48) eine schnelle Komponente der Desensitivierung beobachtet wurde, deren kinetische Konstanten mit denjenigen der intermediären Relaxation identisch waren. Es wurde hieraus die Existenz eines weiteren diskreten intermediären Rezeptorzustandes (I) angenommen (9; s. auch (48)).

Es wurde ein Minimalmodell postuliert, worin die vier beschriebenen Zustände des nAChR (R, A, I, D) in einem vorgeformten Gleichgewicht existieren und zwischen allen Zuständen Übergänge möglich sind (Fig. 3). Effektoren entfalten ihre Wirkung durch Verschiebung des Gleichgewichts (9).

Fig. 3. Vierzustandsmodell des nAChR (aus (17); s. Text).

Agonisten binden bevorzugt an A, I und D und stabilisieren im Gleichgewicht die D-Form, desgleichen Kanalblocker. Der Ionenkanal wird durch Bindung zweier Moleküle Agonist aktiviert. Antagonisten sollen den Ruhezustand stabilisieren (9, 13).

Mittlerweile wurden Zweifel an der Vollständigkeit des Modells geäußert. Von keinem Autor wurden bei Einzelkanalmessungen an synaptischen Membranen in Abwesenheit von Agonisten Kanalöffnungsereignisse registriert (9); dies stellt aber die Vorstellung vom vorgeformten Gleichgewicht aller Rezeptor-Zustände infrage. Lediglich an embryonalen, also wenig differenzierten, Muskelzellen wurden auch spontane Kanalöffnungsereignisse beobachtet (49).

Gegen die Vollständigkeit des Modells spricht auch die Stimulierbarkeit der Kanalligandenbindung durch eine Reihe kompetetiver Antagonisten, z.B. d-Tubocurarin, Hexamethonium u.a. (23, 26, 28, 30, 40, 41), denn letztere stabilisieren hierbei offensichtlich eine vom R-Zustand verschiedene Rezeptorkonformation. Die Bedeutung dieses "antagonistenspezifischen Zustandes" (50) ist unklar.-

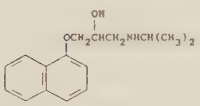
### 1.4.2.2 Der Beta-adrenerge Rezeptor und die Regulation der Adenylatcyclase-Aktivität

Catecholamine bilden die Hauptgruppe der Gewebshormone. Ihre Rezeptoren werden als $Alpha_1$, $Alpha_2$ bzw. $Beta_1$, $Beta_2$ bezeichnet. Gegenstand besonders intensiver Forschung sind die Beta-Rezeptoren, da über sie Herzfrequenz und -kontraktilität ($Beta_1$) sowie der Tonus der glatten Muskulatur von Uterus, Bronchen und Gefäßsystem geregelt werden ($Beta_2$). Blutdrucksenkende Pharmaka ("Betablocker") greifen hier an.- Im Gegensatz zu dem beschriebenen Prinzip der Regulation eines rezeptorassoziierten Ionenkanals (s.o.) transduzieren Beta-Rezeptoren Signale durch Regulation der Adenylatcyclase-Aktivität. Die Aktionsweise der Alpha-Rezeptoren ist nur ansatzweise verstanden; Inhibierung der Adenylatcyclase ($Alpha_2$) bzw. Regulation von $Ca^{2+}$-Flüssen und Phosphatidylinositolumsatz ($Alpha_1$) wurden beobachtet.-
Die bekannten Komponenten und biochemischen Charakteristika der betarezeptorvermittelten Signalumsetzung sollen auch im Hinblick auf Dopaminrezeptoren näher vorgestellt werden, deren Untersuchung einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet (s. B 2). Es lassen sich nämlich Parallelen zwischen den Regulationsmechanismen dopaminerger und Beta-adrenerger Rezeptoren ziehen (52).

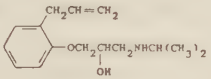
#### 1.4.2.2.1 Liganden und Struktur der Beta-Rezeptoren

Die Rangordnung der cyclasestimulierenden Wirkung von Agonisten des $Beta_1$-Rezeptors lautet: Isoproterenol > Noradrenalin ≈ Adrenalin, beim $Beta_2$-Rezeptor dagegen: Isoproterenol > Adrenalin > Noradrenalin.
Typische Antagonisten des $Beta_1$-Rezeptors sind Atenolol, Betaxolol und Practolol, des $Beta_2$-Rezeptors Butoxamin (53).
Die Konzentration an Beta-Rezeptoren ist naturgemäß sehr viel geringer als etwa die des nAChR im elektrischen Organ von Torpedo; materialaufwendige Untersuchungen werden daher bis auf weiteres nicht möglich sein.
In relativ hoher Dichte (ca. 0,2 pMol/mg Membranprotein) finden sich Beta-Rezeptoren auf Erythrocyten; hieran wur-

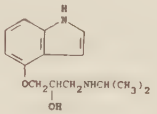
de ein Großteil der verfügbaren Daten gewonnen.
Proteinbestandteile der Beta-Rezeptoren wurden zunächst durch Photoaffinitätsmarkierung identifiziert, später durch Affinitätsreinigung bestätigt.
Genügend spezifische Photoaffinitätsreagenzien sind Azidoderivate der $^{125}$J-markierten Antagonisten Propranolol und Alprenolol ($K_D$ = 5-900 pM, (54, 55, 56)).



Propranolol



Alprenolol



Pindolol

In Vogelerythrocyten, die ausschließlich Beta$_1$-Rezeptoren enthalten, wurden zwei Membranproteine von ca. 39 und 45-50 kD im Verhältnis 3-4:1 markiert (54, 56). Amphibienerythrocyten besitzen nur Beta$_2$-Rezeptoren; hier fand man ein photomarkiertes Peptid von 58 kD (58).
Diese Ergebnisse ließen sich durch Affinitätsreinigung der Digitonin-solubilisierten Rezeptoren mittels Alprenolol-gekoppelter Matrices bestätigen; der Anreicherungsfaktor betrug ca. 12.000 (57).
An Säugergewebe (Herz, Muskel, Lunge von Ratte und Kaninchen) durchgeführte Markierungsversuche lieferten recht widersprüchliche Daten, möglicherweise infolge proteolytischen Abbaus der Rezeptoren; meist fanden sich zwei oder drei markierte Proteine (53).

### 1.4.2.2.2 Bindung von Agonisten und Aktivierung der Adenylat-Cyclase

#### 1.4.2.2.2.1 N-Proteine

Die Wechselwirkung des Rezeptor-Hormonkomplexes mit der Cyclase erfolgt unter Beteiligung eines GTP-bindenden regulatorischen Proteins (N-Protein, (53, 59)), es wurde gereinigt und charakterisiert (59).
Beta-Rezeptoren sind mit Cyclase-stimulierenden N-Prote-

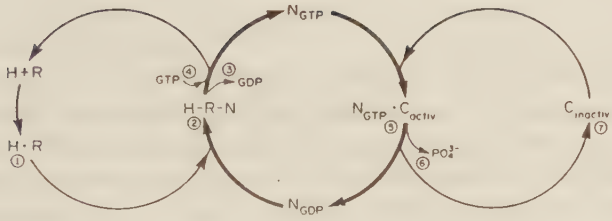
inen ($N_s$ oder $G_s$) gekoppelt; andere Rezeptoren ($Alpha_2$, dopaminerge($D_2$), muscarinisch cholinerge($M_2$) u.v.a.) entfalten ihre Effekte unter Vermittlung inhibitorischer N-Proteine ($N_i$ oder $G_i$, (59)).-

$N_s$ und $N_i$ sind integrale Membranproteine; sie finden sich auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Beide sind Trimere; die Alpha-Untereinheiten ($N_{s\alpha}$ bzw. $N_{i\alpha}$) tragen die GTP-Bindungsstelle, besitzen GTPase-Aktivität und sind durch Choleratoxin ($N_{s\alpha}$) bzw. Pertussistoxin ($N_{i\alpha}$) ADP-ribosylierbar (59, 60); die Molekulargewichte betragen 43 kD ($N_{s\alpha}$) bzw. 41 kD ($N_{i\alpha}$). Die Beta- und Gamma-Untereinheiten besitzen jeweils identische Molekulargewichte (35 kD bzw. 7-10 kD). Rekonstitutionsexperimente mittels isolierter Untereinheiten zeigten, daß der $N_{s\alpha}$xGTP-Komplex die Cyclase aktiviert und die Beta-Untereinheit inhibitorisch auf $N_{s\alpha}$ wirkt (61).-

GTP und nicht hydrolysierbare Analoga (GppNHp) senken die Affinität des Rezeptors für Agonisten, nicht aber Antagonisten (59). Ausschlußchromatographie des in Gegenwart von Agonisten solubilisierten Rezeptorkomplexes ergab ein größeres apparentes Molekulargewicht als bei Verwendung von Antagonisten. Guaninnucleotide führten zur Bildung der kleineren Form aus der größeren (63).

Die genannten Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß Hormon, Rezeptor und N-Protein einen Komplex bilden (HRN-Komplex), der in Gegenwart von Guaninnucleotiden zerfällt. Dies wurde durch Coelution des solubilisierten, durch Choleratoxin ($^{32}P$)ADP-ribosylierten N-Proteins mit dem agonistmarkierten Rezeptor bestätigt (64).

Bildung des HRN-Komplexes erhöht die Affinität des N-Proteins für GTP (65), dessen Bindung den HRN-Komplex destabilisiert. Der $N_s$xGTP-Komplex dissoziiert ab und aktiviert die katalytische Untereinheit der Adenylat-Cyclase (66). Dazu sind $Al^{3+}$ und $Mg^{2+}$ nötig (59).- Durch die endogene GTPase-Aktivität des $N_{s\alpha}$ wird das Signal, und damit die Cyclase, langsam inaktiviert. Nicht spaltbare GTP-Analoga und ADP-Ribosylierung von $N_{s\alpha}$ führen zur permanenten Aktivierung ((59), Fig. 4).-




Rezeptor-Cyclus N-Protein-Cyclus Cyclase-Cyclus

Fig. 4 Schematische Darstellung der Adenylat-Cyclase-Aktivierung durch betaadrenerge Agonisten. R: Rezeptor; N: GTP-bindendes regulatorisches Protein; C: katalytische Untereinheit der Adenylat-Cyclase (aus (53)).

1.4.2.2.2.2 Die Adenylat-Cyclase

Die katalytische Untereinheit der Adenylat-Cyclase wurde solubilisiert und affinitätschromatographisch gereinigt. Das Präparat war bisher sehr instabil; durch Entdeckung des Diterpens Forskolin bekam man einen Stoff in die Hand, der sowohl als Affinitätsligand wie zur Stabilisierung der Cyclase hilfreich ist (67, 68). Forskolin aktiviert die Cyclase auch in Abwesenheit von $N_s$ (69).-
Kürzlich gelang die Rekonstitution eines hormonsensitiven Adenylat-Cyclase-Komplexes aus den gereinigten Komponenten (70).-

1.4.2.2.2.3 Desensitivierung

Das betaadrenerge Rezeptorsystem zeigt das Phänomen der Desensitivierung, d.h. der verminderten Cyclase-Stimulierbarkeit bei Dauerreizung durch Agonisten.
In Froscherythrocyten wurde die Abnahme der Agonistenaffinität bei gleichzeitiger Unempfindlichkeit der Bindung gegenüber Guaninnucleotiden gemessen (71). Diese "entkoppelten" Rezeptoren können internalisiert (72) und später auf der Membran reexponiert werden (73).

An Truthahn-Erythrocyten wurde eine mit der Desensitivierung einhergehende Rezeptorphosphorylierung beobachtet, die durch Antagonisten zu blockieren war (74, 75). cAMP-Analoga scheinen ebenfalls desensitivierend zu wirken (75, 76). Dies könnte auf eine cAMP-abhängige Proteinkinase-Aktivität hindeuten.
In diesem Zusammenhang sei an Greengard's Hypothese erinnert: hierin wird die Vermittlung von postsynaptischen Reizen über cAMP-abhängige Proteinkinasen und Membranproteinphosphorylierung vorgeschlagen (77).-
Zusatz: nach neuesten Daten existiert in dem Detergens $C_8E_{5-9}$ in Gegenwart und Abwesenheit von GTP ein fest assoziierter $N_s$•C-Komplex, der mit dem genannten Detergens aus Truthahn-Erythrocyten extrahiert werden kann (183). Diese Beobachtung ist nicht mit dem "shuttle"-Modell (53; s. Fig. 4) kompatibel, worin die Migration von $N_s$ vom Hormon-Rezeptor-Komplex zur katalytischen Untereinheit (C) der Adenylatcyclase und zurück gefordert wird. Vielmehr wird ein "collision coupling"-Modell zwischen dem $N_s$•C- und dem Hormon-Betarezeptor-Komplex vorgeschlagen.

## 2. Problemstellung

Der Mechanismus der Signalübertragung durch ionenkanal- wie auch cyclaseregulierende Neurorezeptoren ist in weiten Teilen unbekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten biochemische Ansätze zur Klärung diesbezüglicher Fragen vorgelegt werden.

### 2.1 Identifizierung von Ionenkanalkomponenten des nAChR

Eine bestimmte Funktion, die Bindung cholinerger Liganden, kann bislang nur den Alpha-Untereinheiten zugeordnet werden. Lokalisierung, Struktur und Funktionsweise des Ionenkanals sind ungeklärt.
Die Bindungsstelle für Ionenkanalblocker wurde bisher nicht identifiziert. Diese Verbindungen scheinen ihre Wirkung sowohl durch allosterische Effekte wie direkte sterische Interaktionen mit dem Ionenkanal auszuüben (s. Einleitung 1.4.2.1.3).
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten daher Kanalblocker kovalent mit dem Rezeptorprotein verknüpft, die Reaktionen charakterisiert und die Reaktionsprodukte analysiert werden. Die gewonnenen Daten sollten unter Zugrundelegung des Vierzustandsmodells (s. Einleitung 1.4.2.1.4) diskutiert werden.

### 2.2 Dopaminrezeptoren im Zentralnervensystem

Dopaminrezeptoren sind pharmakologisch leidlich, biochemisch kaum charakterisiert. Im ZNS finden sich zumindest zwei Klassen, $D_1$ und $D_2$ (52). Agonistenbindung am $D_1$-Rezeptor bewirkt die Stimulierung der Adenylat-Cyclase-Aktivität (77, 78); der $D_2$-Rezeptor wirkt wahrscheinlich inhibitorisch auf die Cyclase (79, 80, 81).
Auf Ähnlichkeiten in der Aktionsweise betaadrenerger und dopaminerger Rezeptoren wurde bereits hingewiesen (s. Einleitung 1.4.2.2).-

Aufgabe war es, geeignete Präparationmethoden für größere Mengen $D_2$-Rezeptor-haltiger Membranen zu entwickeln, die Rezeptorkonzentration in membrangebundenem Zustand weiter anzureichern und das Präparat durch Bindungsstudien mit dem Antagonisten ($^3$H)Spiroperidol zu charakterisieren. Außerdem sollte der Versuch gemacht werden, durch Anwendung der für den nAChR entwickelten Photomarkierungstechnik Proteinbestandteile des $D_2$-Rezeptors zu identifizieren.

# B Ergebnisse und Diskussion

## B 1 Der Ionenkanal des nikotinischen Acetylcholinrezeptors

### 1.1 Vorbemerkungen

#### 1.1.1 Das elektrische Organ von Torpedo- eine Rezeptorquelle

Dieses Gewebe dient als Quelle nAChR-reicher Membranvesikel (8, 9); sie lassen sich durch einfache Methoden- wiederholtes Homogenisieren und Zentrifugieren und Reinigung über Dichtegradienten- in großen Mengen gewinnen (17, 82). Die natürlichen Funktionen des Rezeptors, insbesondere die kooperative Bindung zweier Moleküle Acetylcholin (83, 84) und die agonistenstimulierbare Ionentranslokation (85), bleiben dabei erhalten.-
Das elektrische Organ ist ein ontogenetisch dem Muskel verwandtes Gewebe; der kontraktile Apparat wurde jedoch zurückgebildet.
Mehrere hundert Einzelzellen, die Electroplaques, Syncitien mit bis zu 1.000 Zellkernen und einer Größe von ca. 10x 10x 0,1 mm, liegen säulenförmig übereinander. Mehrere hundert solcher parallel geschalteter Zellsäulen können durch präsynaptische ACh-Ausschüttung gleichzeitig depolarisiert werden; dabei entstehen kurzzeitig Leistungen von bis zu 2.000 Watt.
Die dorsale Seite des Electroplaques ist reich an $Na^+/K^+$-ATPase, die ventrale trägt auf ihrer stark invaginierten Oberfläche eine Vielzahl rezeptorreicher Synapsen (Fig. 5).

#### 1.1.2 Lokalanästhetika und andere Ionenkanalblocker

Gemeinsam ist all diesen Verbindungen die Fähigkeit zur Blockierung des Ionenkanals des nAChR . Dieser Effekt wird im Vierzustandsmodell (s. Enleitung 1.4.2.1) durch Stabilisierung des desensitivierten Zustands erklärt.

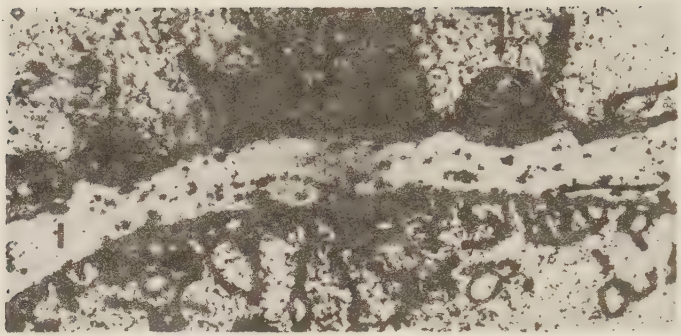


Fig. 5. Querschnitt durch elektrisches Gewebe von Torpedo. Getrennt durch den Extrazellulärraum zwei Electroplaques; oben die stark invaginierte ventrale Seite mit rezeptorreichen Synapsen (Pfeile); unten die dorsale Seite mit der ATPase-reichen Membran der folgenden Zelle (S. Reinhardt, Diplomarbeit, Berlin 1984; Vergrößerung ca. 7.000-fach).

Bestimmte Charakteristika ihrer Wechselwirkung mit dem nAChR, wie die Beschleunigung der Desensitivierungskinetik, wurden bereits diskutiert (s. Einleitung 1.4.3.1).

Neben den klassischen Lokalanästhetika, wie Procain, Tetracain, Lidocain u.a. (83), dem Alkaloid Histrionicotoxin (HTX;(24, 25, 41)), dem Halluzinogen Phencyclidin (PCP;(26, 27)), dem lipophilen Kation Triphenylmethylphosphonium ($TPMP^+$;(28)) und dem Sedativum Chlorpromazin (86; 13, 22, 30), gehören dieser chemisch sehr heterogenen Stoffklasse auch die Detergenzien Triton X-100, Lubrol PX, Na-Cholat u.a. unterhalb ihrer cmc (kritischen Micell-Konzentration) und Fettsäuren (87), schließlich auch Alkohole und allgemeine Anästhetika an.

Pharmakologisch lassen sich Kanalblocker in zwei Gruppen einteilen, nämlich in HTX-sensitiv und HTX-insensitiv bindende (88, 89). Zu den ersteren gehören die Lokalanästhetika Meproadifen und Dibucain, die Detergenzien Triton X-100 und NP-40, PCP und andere. Der zweiten Gruppe sind z.B. Trimethisoquin, Chlorpromazin, Lidocain und Lubrol PX zuzurechnen. Letztere Verbindungen interagieren nämlich im mikromolaren Konzentrationsbereich mit einer Anzahl mittelaffiner Bindungsstellen (ca. 30 pro Rezeptormolekül, $K_D \sim 15$-45 µM) zusätzlich zur Bindung an eine, wohl allen Kanalligan-

den gemeinsame, HTX-sensitive, hochaffine Bindungsstelle ($K_D$ = 0,8 - 4 µM in Abwesenheit bzw. 0,2 - 0,8 µM in Gegenwart von Carb,(88)). Daneben existieren für alle Kanalblokker noch sehr viele niederaffine Bindungsstellen, subsummierbar unter dem Begriff der "unspezifischen Bindungsstellen".
Trimethisoquin und Chlorpromazin stabilisieren den desensitivierten Rezeptorzustand - gemessen über die Zunahme der Dansyl-$C_6$-Cholin-Fluoreszenzintensität(s.Einleitung 1.4.3.1)- gleichermaßen in Gegenwart und Abwesenheit von HTX, d.h. über ihre hochaffine wie die mittelaffinen Bindungsstellen (89).
HTX besitzt kaum desensitivierende Wirkung (41, 88, 89).
Im Gegensatz zu den Lokalanästhetika zeigen ($^3$H)TPMP$^+$, ($^3$H)PCP und ($^3$H)HTX signifikante Bindung auch in Abwesenheit cholinerger Liganden (27, 28, 41). Letztere stimulieren die Bindung der genannten (25, 27, 28, 41, 88, 89) und anderer Kanalblocker, z.B. ($^3$H)Trimethisoquin (90) und ($^3$H)Meproadifen (91).
Aufgrund elektrophysiologischer Befunde ist die Einteilung der Kanalliganden in drei Klassen möglich (86):
verschiedene Lokalanästhetika (Procain, Tetracain, Lidocain u.a.) und Trimethisoquin blockieren Endplattenpotentiale effektiver bei negativerem Membranpotential.
HTX, PCP und TPMP$^+$ (92) blockieren im depolarisierten Zustand wirksamer.
Dibucain, Benzocain und Chlorpromazin sowie Detergenzien und andere Stoffe zeigen keine Potentialabhängigkeit iher Wirkung.
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Kanalblocker sowohl hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens an den nAChR wie der Potentialabhängigkeit ihrer depolarisierungshemmenden Wirkung nach Unterschiede aufweisen.
Es ist nicht ohne weiteres ersichtlich, wie diese Befunde mit der Annahme eines einheitlichen Wirkungsschemas unter Beteiligung einer allosterischen Bindungsstelle - entsprechend dem Vierzustandsmodell - in Einklang gebracht werden können.

Eine alternative Betrachtungsweise erscheint mindestens ebenso überzeugend:
Kanalblocker (vor allem hochaffin bindende, wie PCP, HTX, $TPMP^+$ u.a.) blockieren das Ionophor primär durch sterische Interaktion.
Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß $TPMP^+$ den agoniststimulierten Ionenfluß bei gleichzeitiger Zugabe beider Effektoren völlig blockieren kann (28). Ähnliches gilt für HTX (41), das übrigens kaum desensitivierende Wirkung besitzt.
Der Prozeß der Desensitivierung läuft im Bereich von Sekunden ab (s. Einleitung 1.4.2.1), kann daher mit Sicherheit nicht für die augenblickliche Blockierung des Ionophors verantwortlich gemacht werden. Selbst Beschleunigung der Desensitivierung durch Kanalliganden um den Faktor 10 (berichtet wird vom Faktor 3-8 (9; 38)) genügt sicherlich nicht zur momentanen Blockade.- Die schnelle Messung der Desensitivierungskinetik sowie der Blockade des Ionophors, z.B. durch $TPMP^+$, könnte starke Argumente für direkte sterische Interaktionen von Blocker und Ionenkanal liefern.
Argumente hierfür lieferte neben elektrophysiologischen Studien (s. Einleitung 1.4.3.1) auch die Messung der ($^3$H)PCP-Assoziationskinetik in Gegenwart cholinerger Effektoren (30, 40). ($^3$H)PCP bindet bei gleichzeitiger Zugabe mit dem Agonisten schnell an den nAChR, während die Bindung an den desensitivierten Zustand bzw. in Gegenwart des Antagonisten d-Tubocurarin sehr viel langsamer verläuft.
Eine plausible Erklärung hierfür böte die Annahme der freien Zugänglichkeit der Bindungsstelle nur im aktiven Zustand, der sterischen Hinderung aber in den übrigen Fällen (30).
Zu ähnlichen Ergebnissen führte der Vergleich der Änderung der Quinacrin-Fluoreszenzintensität unter Einfluß cholinerger Agonisten und Antagonisten (40).
Die Beschleunigung der Desensitivierung, zumindest durch Kanalblocker wie allgemeine Anästhetika, Alkohole und Fettsäuren, mag eher den Charakter einer wenig spezifischen Interaktion dieser Stoffe mit der Lipidphase besitzen.

## 1.2 $TPMP^+$- Kanalligand und Photoaffinitätsreagenz des nAChR

Das lipophile Kation $TPMP^+$ wird weithin zur biochemischen Messung von Membranpotentialen verwandt (93). Als Ionenkanalblocker wurde es von L. Lauffer erkannt und beschrieben (28, 93, 94).- Cholinerge Agonisten, in geringerem Ausmaße auch Antagonisten, nicht aber Alpha-Toxine, stimulieren die $TPMP^+$-Bindung an nAChR-reiche Membranen. Die maximale Stimulierung erfolgt bei $10^{-5}$ M Carbamoylcholin (Carb). Die $K_D$ beträgt 13 µM in Abwesenheit, 1,5 µM in Anwesenheit von $10^{-5}$ M Carb.- $TPMP^+$ kompetiert erst oberhalb $10^{-4}$ M mit Carb um die Agonistenbindungsstelle (28).-

Es zeigte sich, daß $TPMP^+$ auch photochemische Reaktivität besitzt: ähnlich wie Chlorpromazin, PCP und andere Lokalanästhetika reagiert es bei UV-Bestrahlung kovalent mit dem Rezeptorprotein, ohne daß Derivatisierung, z.B. Einführung einer Azidogruppe, nötig wäre (22, 23). Gegenüber den genannten Verbindungen besitzt $TPMP^+$ sogar entscheidende Vorteile (s.u.). Es schien daher als Photoaffinitäts-Reagenz geeignet, genauere Aufschlüsse über strukturelle Bestandteile des Ionenkanals zu geben.- Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit steht zum einen die Charakterisierung der Photoreaktion im Bindungsgleichgewicht bei verschiedenen funktionellen Rezeptorzuständen. Zum anderen wurde die Kinetik der Reaktion in physiologisch relevantem Zeitmaßstab aufgelöst und der Versuch gemacht, die photochemisch markierten Rezeptorzustände auf der Grundlage des Vierzustandsmodells zu identifizieren.

### 1.2.1 Studien im Bindungsgleichgewicht

1.2.1.1 Charakterisierung der Photoreaktion

1.2.1.1.1 Zeitabhängigkeit der kovalenten ($^3$H)TPMP$^+$-Inkorporation

Steigende Bestrahlzeit des Gemisches von Rezeptormembranen und dem Kanalliganden ($^3$H)TPMP$^+$ mit UV-Licht führt zu dessen verstärkter Photoreaktion mit den Rezeptoruntereinheiten (Fig. 6).
Vergleich der $R_F$-Werte der Rezeptorbanden des gefärbten Gels mit denen der fluorographischen Schwärzungen ermöglichten folgende Zuordnung (Tab. 1):

| Rezeptoruntereinheit (Färbung) | $R_F$ | Fluorogramm (v.u.n.o.) | $R_F$ |
|---|---|---|---|
| Alpha | 0,60 | Alpha? | 0,61 |
| Beta | 0,49 | Beta? | 0,50 |
| Gamma | 0,45 | Gamma? | - |
| Delta | o,39 | Delta? | 0,40 |

Tab. 1 . Zuordnung der fluorographischen Banden zu den Rezeptorbanden der Serva-Blau- Färbung.

Fig. 6. Zeitabhängigkeit der Photoreaktion von ($^3$H)TPMP$^+$ und nAChR.- A: ohne zusätzlichen Effektor; B: in Gegenwart von $10^{-4}$ M Carb. Die Bestrahlungszeiten: Spur 1: 0; Spur 2: 1; Spur 3: 3; Spur 4: 5; Spur 5: 7 min.- 18 µl Membranen (1 mg Protein/ml), 12 µl Puffer bzw. Carb ($10^{-4}$ M) und 6 µl ($^3$H)TPMP$^+$ (1 µM, 2 µCi) wurden 5 min bei Raumtemp. inkubiert, dannfür die angegebenen Zeiten bei 4°C bestrahlt und elektrophoretisiert.Die Gele wurden fixiertund gefärbt, mit 1 M Na-Salicylat getränkt und bei- 80°C fluorographiert.- C: densitometrische Auswertung der Schwärzungen des Röntgenfilms an den Positionen der Delta-Untereinheiten (aus B).

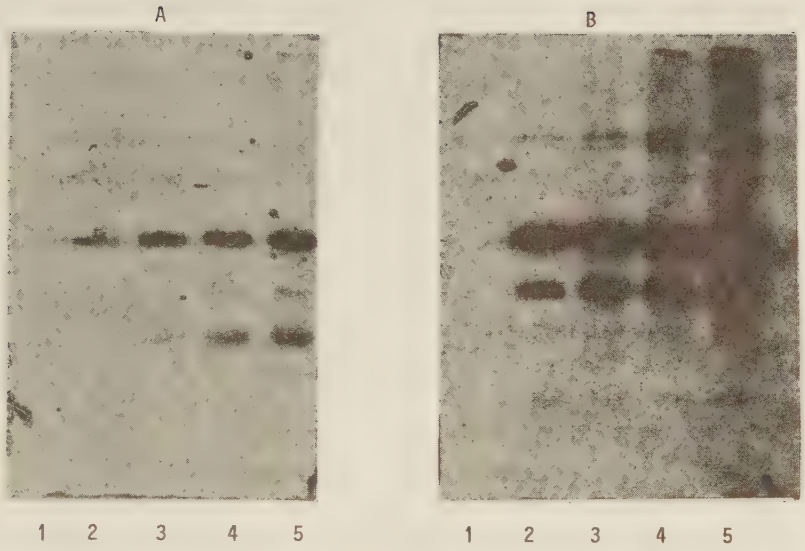



Fig. 6 . Legende s. vorige Seite

Wie die densitometrische Analyse der fluorographischen Schwärzung zeigt, steigt die kovalente ($^3$H)TPMP$^+$-Inkorporation mit zunehmender Bestrahlzeit an, strebt jedoch einem Grenzwert zu (Fig. 6 C).- Lange Bestrahlzeiten verbieten sich allerdings, da UV-Bestrahlung zur Polymerisierung des Rezeptorproteins führt: schon nach dreiminütiger Photoreaktionsdauer findet sich relativ viel Material, das nicht ins Elektrophoresegel eindringt (nicht gezeigt).- Alle folgenden Experimente wurden bei zweiminütiger Bestrahlzeit durchgeführt.- Die Stimulierbarkeit der ($^3$H)TPMP$^+$-Inkorporation durch cholinerge Effektoren stellt einen interessanten dynamischen Vorgang dar, der im folgenden durch Gleichgewichtsstudien charakterisiert und kinetisch analysiert werden soll.

1.2.1.1.2 Aktionsspektrum der Photoreaktion

Neben der Ermittlung der effektivsten Wellenlänge sollte das Aktionsspektrum Aufschluß darüber erteilen, ob der Ligand oder das Rezeptorprotein den photoaktivierbaren Anteil darstellen (Fig. 7 A).- Es fand sich ein scharfes Maximum des Radioaktivitätseinbaus bei 270 nm. Der Vergleich mit den Absorptionsspektren von TPMP$^+$ und detergens-solubilisierter Rezeptoren deutet auf Anregung aromatischer Aminosäurereste als notwendigem Teilereignis der Photoreaktion. Die Anregbarkeit des Radioliganden allein genügt nicht, denn das Ausbeutemaximum liegt genau bei einem relativen Minimum des TPMP$^+$-Absorptionsspektrums (270 nm). Dieser Schluß wird durch ein weiteres Experiment gestützt. (s. B 1.2.1.1.3).- Das TPMP$^+$-Absorptionsspektrum verändert sich auch durch langdauernde UV-Bestrahlung nicht (Fig. 7 B). Es finden demnach keinerlei Selbstverknüpfungen oder Zerfälle des Photoreagenz' statt. Die kann als Argument dafür gelten, daß tatsächlich ($^3$H)TPMP$^+$, nicht aber ein Umwandlungsprodukt das aktive Photoreagenz darstellt.

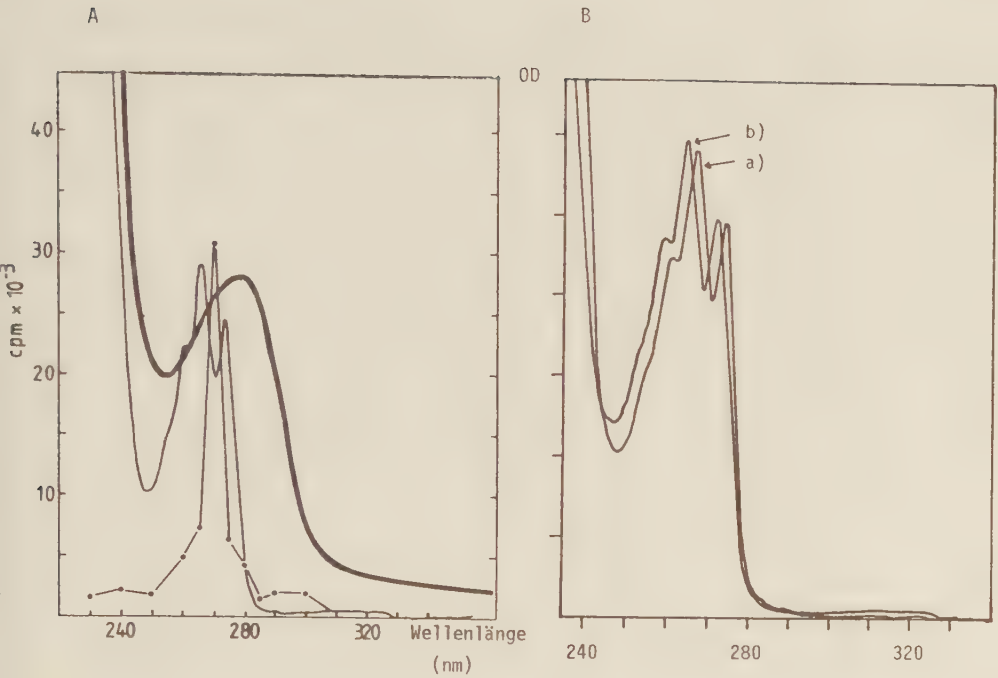



Fig. 7.A:Aktionsspektrum der Photoreaktion.- Rezeptormembranen (1 mg Protein/ml), ($^3$H)TPMP$^+$ (2 µCi, 1 µM) und Carb ($10^{-4}$ M) wurden in 50,5 µl-Ansätzen mit monochromatischem Licht verschiedener Wellenlängen bestrahlt; die gebundene Radioaktivität wurde durch Adsorption der Triton X-100-solubilisierten Membranen an DEAE-Filter bestimmt.- Dicke Linie: Absorptionsspektrum des in 4% Na-Cholat/100 mM Na/$PO_4$, pH 7,4 solubilisierten Rezeptors. Dünne Linie: Absorptionsspektrum von $10^{-4}$ M TPMP$^+$; (•) rezeptorgebundene Radioaktivität.- B: Absorptionsspektrum von TPMP$^+$ a) vor, b) nach Bestrahlung einer 0,25 mM Lösung. Die Bestrahlung erfolgte für 60 min auf die beschriebene Weise (s. Fig. 6).

1.2.1.1.3 Selektivität und Speziesspezifität der Photoreaktion

Im Vergleich zu anderen Kanalblockern reagiert ($^3$H)TPMP$^+$ spezifischer (Fig. 6, 9; s. auch (22, 89)): es wird kaum Radioaktivität in Lipidmaterial inkorporiert; die Gamma-Polypeptidkette ist immer frei von Radioaktivität. Schließlich ist die effektorstimulierte Verschiebung des inkorporierten ($^3$H)TPMP$^+$ deutlicher ausgeprägt (vgl. 1.2.1.2 !).- Diese Verschiebung ist speziesspezifisch nur bei nAChR von Torpedo marmorata, nicht aber Torpedo californica, zu beobachten (vgl. Fig. 8 und 10 B). Die radioaktive Markierung der Alpha-Untereinheiten beider Species erfolgt mit etwa gleicher Quantität, die Beta- und Deltaketten des Torpedo californica-Rezeptors werden nicht markiert.- In einem Kontrollexperiment wurde sichergestellt, daß die unterschiedliche Photoreaktivität beider Species nicht auf eine bloße Verschiebung des Aktivierbarkeitsmaximums zu anderen Wellenlängen zurückzuführen ist (s. Fig. 7).- Das Ausbleiben der Stimulierbarkeit der ($^3$H)TPMP$^+$-Inkorporation in den nAChR der Species T. californica legt den Schluß nahe, daß Anregung des Proteins essentiell für das Zustandekommen der Photoreaktion ist. Als Ursache der Nichtanregbarkeit ist der Austausch einer aromatischen, also UV-aktiven, gegen eine aliphatische Aminosäure anzunehmen. Der Vergleich der Primärstrukturen der Deltauntereinheiten beider Species sollte unmittelbar die Lokalisierung des Reaktionsortes in der Sequenz ermöglichen. Leider liegt diese bislang nur für die Species T.californica vor (11).- Es handelt sich hierbei, soweit bekannt, um den ersten beschriebenen Unterschied im biochemischen Verhalten zwischen den ACh-Rezeptoren beider Species.

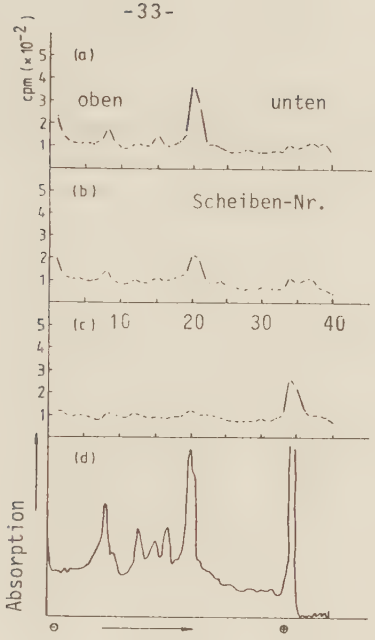



Fig. 8. Photoreaktion zwischen ($^3$H)TPMP$^+$ und nAChR von T.californica. Quantitative Bestimmung der gebundenen Radioaktivität.- 30 µl-Proben wurden nach Bestrahlung über zylindrische SDS-Gele elektrophoretisiert; diese wurden fixiert, gefärbt. gescannt, in 2 mm dicke Scheiben geschnitten und die enthaltene Radioaktivität gemessen.- A: ohne Effektor; B: + $10^{-4}$ M Carb; C: + $10^{-5}$ M BTX; D: Absorption eines gefärbten Parallelgels (scan bei 550 nm).

1.2.1.1.4 Ausbeutebetrachtung

Die quantitative Bestimmung der in die Delta-Untereinheit (Fig. 10B) bzw. den gesamten Rezeptorkomplex (Fig. 7) inkorporierten Radioaktivitätsmengen ergab 12.000 bzw. 31.000 cpm. Bei eingesetzten 2 µCi (entspr. 2 Mio. cpm oder 1 µM im Ansatz) errechnet sich eine Ausbeute von 0,5-1,5 %. Die Rezeptorkonzentration betrug ebenfalls 1 µM; es wurden demnach analog 0,5-1,5 % der Rezeptoren markiert.

Dieser Anteil ist zweifellos relativ gering. Letztgültige Beweise für die Repäsentativität von an diesem Bruchteil gewonnenen Daten sind nicht zu liefern.- Photoreaktionen von nicht für diesen Zweck speziell derivatisierten Molekülen liefern allerdings kaum je höhere Ausbeuten (vgl. (22, 95, 174). Die Selektion einer insgesamt bedeutungslosen Sonderklasse von Rezeptormolekülen ist also wenig wahrscheinlich .- Ein gewichtigeres Argument für die Signifikanz der vorgelegten Ergebnisse ist die völlige pharmakologische Parallelität von an der Gesamtpopulation gewonnenen ($^3$H)TPMP$^+$-Gleichgewichtsbindungsdaten und den Photomarkierungsstudien. Die vorliegenden Daten stehen somit im Einklang mit dem Stand der Forschung.- Die, verglichen mit dem in seinem Bindungsverhalten ähnlichen PCP wesentlich höhere Photoreaktivität (s.22) bei gleichzeitig hoher Spezifität ließen ($^3$H)TPMP$^+$ als Photoliganden der Wahl erscheinen.

1.2.1.1.5 Bemerkungen

Anfänglich wurden die zur Photoreaktion verwendeten Lösungen $N_2$-begast, um den Radikalfänger Sauerstoff zu entfernen. Da jedoch keinerlei Einfluß auf die entstehenden Reaktionsprodukte festzustellen war, wurden die Lösungen im folgenden nur gründlich entgast.- Das Bindungsgleichgewicht zwischen nAChR und ($^3$H)TPMP$^+$ ist bei Raumtemperatur nach 5 min erreicht (28); gleiches gilt für die Photoreaktion: die Ausbeute läßt sich durch längere Vorinkubation nicht weiter erhöhen (Fig. 9).

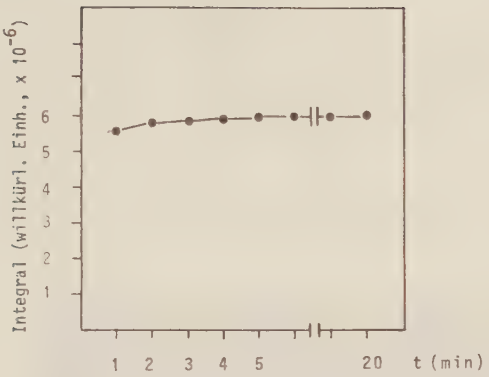



Fig. 9. Kovalente ($^3$H)TPMP$^+$-Inkorporation in die Deltakette des nAChR. Abhängigkeit des Radioaktivitätseinbaus von der Vorinkubationszeit der Membranen mit Effektoren. Rezeptormembranen wurden für verschiedene Zeiten mit 1 µM ($^3$H)TPMP$^+$ und $10^{-4}$ M Carb bei Raumtemp. inkubiert und dann 1 min bei 4°C bestrahlt. Die Proben wurden elektrophoretisiertund das Gel fluorographiert. Die Schwärzungen des Röntgenfilms wurden densitometrisch ausgewertet.

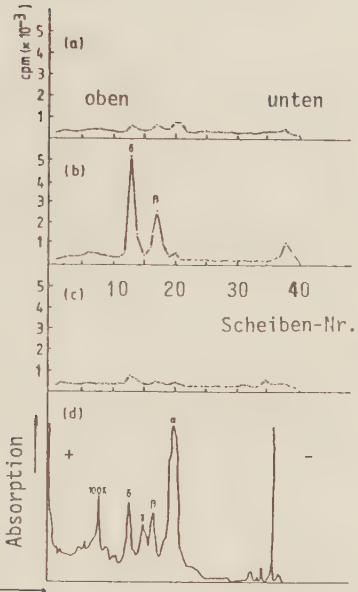
1.2.1.2 Agonisten und Antagonisten bewirken eine Verschiebung des Photomarkierungsmusters der Rezeptoruntereinheiten

Im Gleichgewichtsbindungstest wurde die Stimulierbarkeit der ($^3$H)TPMP$^+$-Bindung durch cholinerge Liganden beobachtet, wobei Agonisten effektiver waren als Antagonisten. BTX blieb ohne Wirkung (28).- Die gleiche Effektorspezifität findet sich bezüglich der Photoreaktion wieder: der Agonist Carbamoylcholin bewirkt ca. zehn-, der Antagonist d-Tubocurarin etwa sechsfache Stimulierung des kovalenten Einbaus (Fig. 10). -Zum einen fällt die geringere Inkorporation in die Alphakette bei Anwesenheit cholinerger Effektoren auf; zum anderen erfolgt zugleich ein dramatischer Anstieg der an die Beta- und besonders die Deltakette gebundenen Radioaktivität.- Die Antagonisten Hexamethonium und d-Tubocurarin

A

Fig. 10. Kovalente Markierung des nAChR durch ($^3$H)TPMP$^+$ unter einfluß cholinerger Effektoren.- Die experimentellen Parameter wurden in Fig. 6 beschrieben. Die Konzentrationen cholinerger Effektoren betrugen jeweils $10^{-4}$ M. A: Fluorogramm; die Effektoren: Spur 1: ohne; Spur 2: + Carb; Spur 3: + Hexamethonium; Spur 4: + Decamethonium; Spur 5: + Flaxedil; Spur 6: + d-Tubocurarin; Spur 7: + Procain; Spur 8: + Tetracain (s. B 1.2.1.2).- B: Quantitative Bestimmung der kovalent gebundenen Radioaktivität.- Die experimentellen Bedingungen wurden in Fig. 8 beschrieben. a) ohne Effektor; b) + $10^{-4}$ M Carb; c) + $10^{-5}$ M BTX; d) Absorptionsscan eines Parallelgels (550 nm).

Fig. 10 B
(Legende s. vorige Seite)



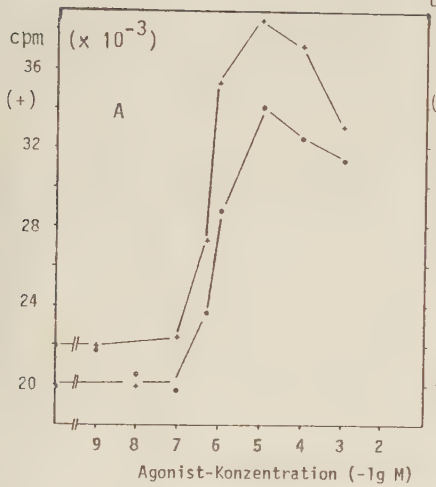



Fig. 11

Fig. 11. Dosis-Wirkungs-Kurve der agoniststimulierten ($^3$H)TPMP$^+$-Bindung an den nAChR.- A: kovalent an die Deltakette gebundene Radioaktivität wurde durch Ausschneiden der der Banden aus dem gefärbten Gel bestimmt.Die Experimente wurden durchgeführt wie in Fig. 6 beschrieben. Effektoren: ( ● ) Carb; (+) ACh (jeweils $10^{-4}$ M). Im letzten Falle ging der Agonist-Zugabe 30-minütige Inkubation mit $10^{-4}$ M Eserin voraus. B: im Gleichgewicht an Rezeptormembranen gebundenes ($^3$H)TPMP$^+$ wurde im Filtrationstest bestimmt (aus (28)).

zeigen etwa gleiche , Flaxedil dagegen sehr viel schwächer stimulierende Wirkung (s.Diskussion).- Als Ursache der Verschiebung des Markierungsmusters ist eine Konformationsänderung im Protein zu suchen; sie wird durch Carb, in unterschiedlichen Ausmaßen auch durch Antagonisten verursacht. Ihre Bedeutung ist nicht ohne weiteres ersichtlich.- Der Einfluß von BTX wird ausführlicher dargestellt werden (s.1.2.1.3).- In Gegenwart von Carb finden sich außerdem zwei weitere radioaktive Banden von ca. 120 und 130 kD Größe, die ihren Molekulargewichten nach kovalente Verknüpfung von Beta- und Delta- bzw. zweier Deltaketten anzeigen könnten, wobei $(^3H)TPMP^+$ als "Brücke" fungieren würde .

Um Aufschluß über das funktionelle Korrelat der agonistst imulierten Konformationsänderung zu erhalten, wurde die Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit quantitativ bestimmt (Fig. 11). Die Agonisten Carb und ACh entfalten ihre halbmaximalen Effekte bei etwa 0,5 µM; dies entspricht etwa der für die Desensitivierung gemessenen halbmaximalen Effektorkonzentration (36, 37, 43). Die Aktivierung des Ionenkanals besitzt jedoch eine 20-fach höhere $EC_{50}$ (48, 96; 43). Die Kanalöffnung ist demnach kein essentielles Ereignis für die agonistst imulierte Verschiebung bzw. Stimulierung der $(^3H)TPMP^+$-Markierung des nAChR.- Auffällig ist der Radioaktivitätsabfall oberhalb $10^{-5}$ molarer Agonistenkonzentration. Gleiches wird bei der $(^3H)TPMP^+$-Gleichgewichtsbindung beobachtet (Fig. 11 B): ein Argument dafür, daß die Photoreaktion und die $(^3H)TPMP^+$-Gleichgewichtsbindung an einer gemeinsamen Bindungsstelle erfolgen.

### 1.2.1.2 Effekt nichtkompetitiver Antagonisten

Lokalanästhetika und andere Kanalliganden, so auch $TPMP^+$, blockieren den Ionenkanal, wobei mit großer Wahrscheinlichkeit sterische Interaktionen der Liganden mit dem Ionophor beteiligt sind ((28); s. B 1.1.2).
Lokalanästhetika verhindern in $10^{-4}$ molarer Konzentration, wenn auch in unterschiedlichen Ausmaßen, die Photomarkierung des nAChR durch $(^3H)TPMP^+$. Während Procain nur Teilwirkung zeigt, beseitigt Tetracain die kovalente Markierung nahezu völlig (Fig. 10). Sehr ähnliche Beobachtungen wurden bei Gleichgewichtsbindungsstudien mit dem Kanalblocker $(^3H)H_{12}$-HTX (40 nM) gemacht: Lidocain verdrängt $(^3H)H_{12}$-HTX lediglich zu 9%, Procain zu 33%, Tetracain aber zu 83% (97; alle Lokalanästhetika 400 µM). - Hierin spiegelt sich die geringere Selektivität und Affinität der Lokalanästhetika zum nAChR, verglichen etwa mit PCP oder HTX, wieder. - Leider standen diese hochspezifischen Kanalblocker im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung.- Jedoch ist der Schluß erlaubt, daß Lokalanästhetika den kovalenten $(^3H)TPMP^+$-Einbau in den nAChR verringern oder sogar verhindern können, da diese Liganden um gemeinsame Bindungsstellen kompetieren,und die Photoreaktion von $(^3H)TPMP^+$ und Rezeptor an dieser Bindungsstelle erfolgt.

1.2.1.3 Untersuchung der Wirkung von Alpha-Bungarotoxin

In Gleichgewichtsbindungsstudien zeigte sich keinerlei Stimulierbarkeit der ($^3$H)TPMP$^+$-Bindung an den nAChR durch BTX (28). Bezüglich der Photoreaktion schien es anfänglich, als wäre das Gegenteil der Fall. Dies stellte sich jedoch als ein Artefakt heraus, das nur mit Toxin-Proben der Firma Boehringer zu erhalten war (Fig. 12).Den gleichen Effekt zeigte nämlich Phospholipase $A_2$, während Phospholipase D das ($^3$H)TPMP$^+$-Markierungsmuster nicht beeinflußte (Fig. 13). Phospholipase $A_2$-Aktivität ließ sich in BTX-Präparaten der Firma Boehringer nachweisen, während Toxin-Proben anderer Herkunft diese Verunreinigung in weit geringerem Maße aufwiesen (Fig. 14).

Bestimmte $A_2$-Lipasen desensitivieren den nAChR (98,99), möglicherweise durch Freisetzung von Fettsäuren (87). (Lipase $A_2$ spaltet Phosphatide unter Freisetzung von Lysophosphatiden und Fettsäuren). Lysophosphatidylcholin und ungesättigte Fettsäuren scheinen den Ionenkanal auch durch andere Mechanismen (Interaktion mit Membranlipiden) zu blockieren (98).
Somit läßt sich die unter Lipase $A_2$-Einfluß beobachtete Stimulierung der photochemischen ($^3$H)TPMP$^+$-Markierung (Fig. 12, 13) möglicherweise auf Desensitivierung des AChR durch enzymatische Spaltprodukte zurückführen.
Weitgehend Lipase $A_2$-freie BTX-Präparationen beeinflussen - wie auch in Gleichgewichtsbindungsstudien (28) - die ($^3$H)TPMP$^+$-Markierung des nAChR kaum (vgl. Fig. 13, Spur 1-3 u. Fig. 14).-
Der Einfluß von Proteasen wurde ebenfalls untersucht, da bestimmte BTX-Präparate (Boehringer) Verunreinigungen durch diese Enzymaktivität aufweisen (23).
Trypsin zeigt nur geringe Wirkung auf das Markierungsmuster (Fig. 12): in Höhe der Beta-Kette tritt verstärkt eine Bande auf; es handelt sich möglicherweise um ein proteolytisches Abbauprodukt der Deltakette ((101); s. auch folgenden Abschnitt).

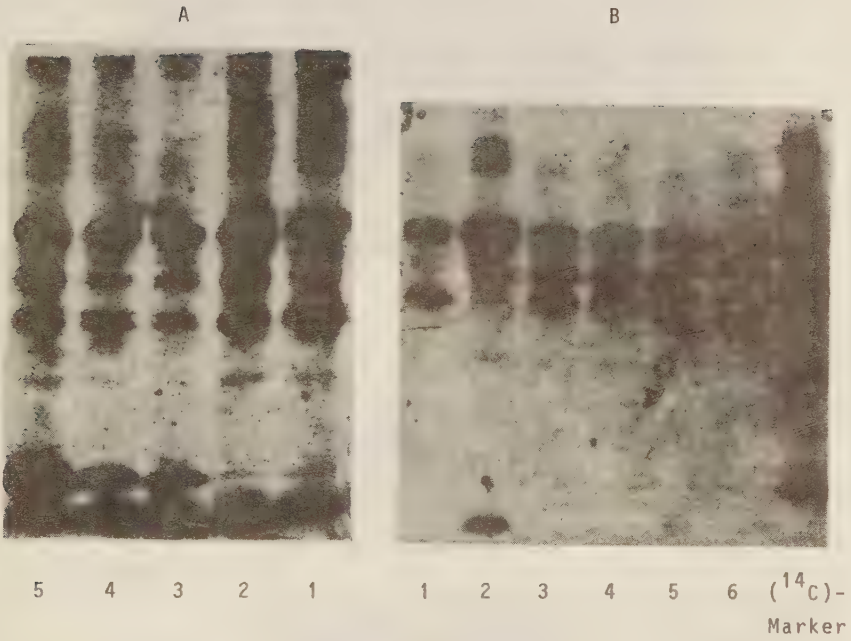



Fig. 12. Einfluß verschiedener BTX-Präparationen (A) und von Trypsin auf das kovalente ($^{3}$H)TPMP$^{+}$-Markierungsmuster des nAChR.- A: Spur 1: ohne Effektor; Spur 2: +$10^{-4}$ M Carb; Spur 3: + $10^{-5}$ M BTX (Boehringer); Spur 4: + $10^{-5}$ BTX (Sigma); Spur 5: + $10^{-5}$ M BTX (selbst gereinigt).- B: Rezeptormembranen wurden bei Raumtemp. mit steigenden Trypsin-Konzentrationen inkubiert.- Spur 1: ohne Effektor; Spur 2: + $10^{-4}$ M Carb; Spur 3: + 12 ng Trypsin/µl Membransuspension; Spur 4: + 9 ng/µl; Spur 5: + 6 ng/µl.- Die Ausführung des Experiments erfolgte wie in Fig. 6 beschrieben.

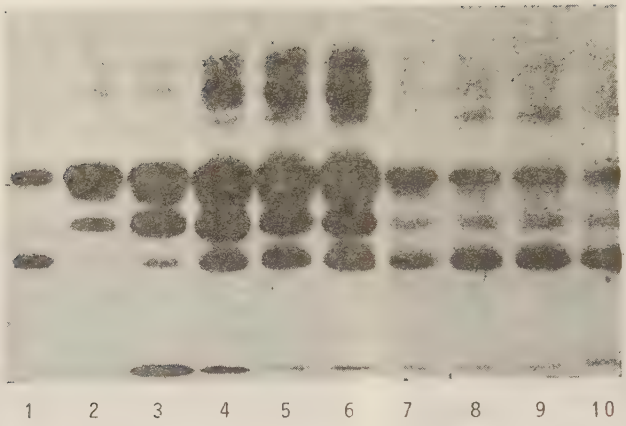



Fig. 13. Effekt der Phospholipasen $A_2$ und D auf das kovalente ($^3$H)TPMP$^+$-Markierungsmuster .- Rezeptormembranen (2 mg/ml Protein,18 µl) wurden mit den angegebenen Enzymmengen 1 h bei Rt. inkubiert und weiterbehandelt wie in Fig.6 beschrieben.- Spur 1: ohne Effektor; Spur 2: + $10^{-4}$ M Carb; Spur 3: + $2x10^{-2}$ U Lipase $A_2$; Spur 4: + $2x10^{-3}$ U; Spur 5: + $2x10^{-4}$ U; Spur 6: + $2x10^{-2}$ U Lipase D; Spur 7: + $2x10^{-3}$ U; Spur 8: + $2x10^{-4}$ U.

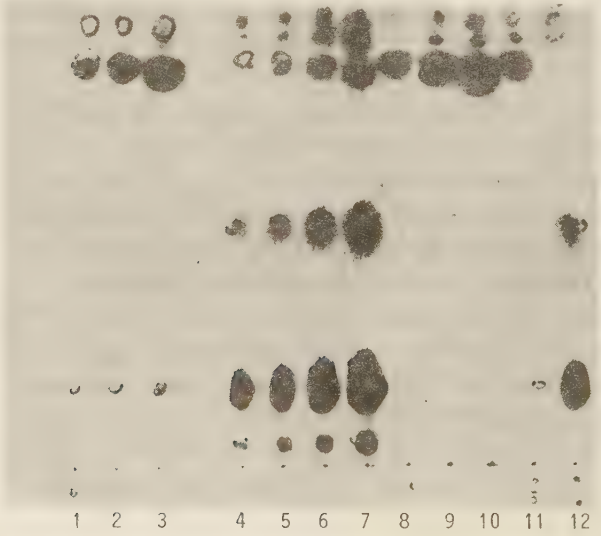
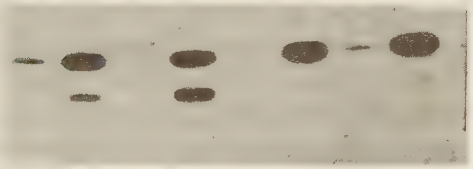



Fig. 14. Legende s. folgende Seite

Fig. 14. Lipase $A_2$-Aktivität in BTX-Präparaten.- 100 µg Phosphatidylcholin wurden mit 10 µg BTX bzw. $10^{-3}$ u Lipase $A_2$ inkubiert (60 min /Raumtemp.; Gesamtvol. 100 µl). Die Proben wurden mit 60 µl $CHCl_3$/Methanol (2:1) extrahiert und jeweils 2,5; 5; 10 µl auf eine DC-Platte (Kieselgel) aufgetragen, die in $CHCl_3$/Methanol/ $H_2O$ (65:25:4) chromatographiert und mit $J_2$-Dampf angefärbt wurde.- Spuren 1-3: Proben enthielten BTX (Boehringer); Spuren 4-7: Proben enthielten selbstgereinigtes BTX; Spuren 8-11:Proben enthielten Lipase $A_2$; Spur 12: Phosphatidylcholin (Referenz, 10 µl).



1 2 3 4 5 6 7 8

Fig. 15. Effekt von DTT und EDTA auf das kovalente ($^3$H)$TPMP^+$-Markierungsmuster.- DTT (5 mM) und EDTA (0,2 mM) wurden 5 min vor Bestrahlung zugegeben; im letzten Fall war der Inkubationspuffer $Ca^{2+}$- und $Mg^{2+}$-frei.- Spur 1: ohne Effektor; Spur 2: + $10^{-4}$ M Carb; Spur 3: + DTT; Spur 4: + DTT, + Carb; Spur 5: + EDTA; Spur6: + EDTA, + Carb; Spur 7: + DTT, + EDTA; Spur 8: + DTT, + EDTA, + Carb.- Die Experimente verliefen wie in Fig. 6 beschrieben.

1.2.1.4 Einfluß von divalenten Kationen und Thiolreagenzien

Wie im vorigen Abschnitt berichtet, tritt unter Trypsin-Einfluß verstärkt ein ($^3$H)TPMP$^+$-markiertes Protein vom apparenten Molekulargewicht der Beta-Kette auf; eben diese elektrophoretische Mobilität besitzt ein beschriebenes proteolytisches Fragment der Delta-Untereinheit (101). Es sollte daher die Frage geklärt werden, ob die Bande vom apparenten Molekulargewicht der Betakette ein proteolytisches Artefakt darstellt.- Hierzu wurden die Effekte der Thiol- bzw. Metalloproteaseinhibitoren Dithiothreit (DTT) bzw. EDTA untersucht.- Während DTT ohne Einfluß blieb, trat bei UV-Bestrahlung in Gegenwart von EDTA eine sehr viel schwächer radioaktiv markierte Bande an der für die Beta-Kette erwarteten Position auf (Fig. 15). Für diesen Befund bieten sich zwei alternative Erklärungsmöglichkeiten an: entweder liegt tatsächlich ein proteolytisches Artefakt vor, oder es tritt in Abwesenheit von $Ca^{2+}$ und $Mg^{2+}$ eine Änderung der Quartärstruktur auf, sodaß die Betakette weniger effizient photomarkierbar ist. Der Vergleich der durch limitierten proteolytischen Abbau erhaltenen Fragmente der isolierten Betakette und der beschriebenen photomarkierten Bande gleicher elektrophoretischer Mobilität sollte eine Klärung ermöglichen.

### 1.2.1.5 Veränderung des Markierungsmusters durch Altern des Membranpräparats

Während bei frisch präparierten nAChR-reichen Membranvesikeln kaum ($^3$H)TPMP$^+$-Photomarkierung von Membranlipidmaterial zu beobachten ist, zeigt sich bei mehrere Tage alten Präparaten eine starke Zunahme. Außerdem weist die Deltakette bei Verwendung gealterter Membranen auch in Abwesenheit von cholinergen Effektoren starke radioaktive Markierung auf, sodaß kaum mehr Stimulierung zu beobachten ist (Fig. 16).
Mitunter allerdings fanden sich solche Effekte auch bei frischen Präparaten. Die Ursache hierfür konnte nicht eindeutig geklärt werden. Möglicherweise spielen endogene Lipase-Aktivität (s. hierzu Ergebnisse 1.2.1.3) bzw. Lipidoxidation eine Rolle.
Alterung des Membranpräparats geht einher mit fortschreitender Desensitivierung des nAChR (36). Dies kann als Argument für die Beteiligung der Desensitivierung bei der alterungsbedingten Stimulierung der kovalenten ($^3$H)TPMP$^+$-Inkorporation aufgefaßt werden.

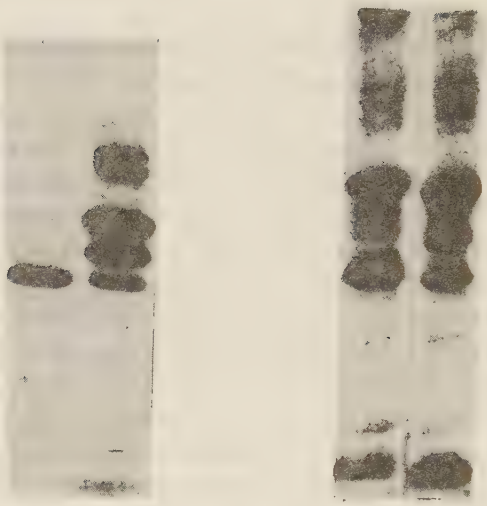



Fig. 16. Einfluß der Alterung des Membranpräparats auf das ($^3$H)TPMP$^+$-Markierungsmuster. Spur 1: frische Membranen, ohne Effektor; 2: wie 1, + $10^{-4}$ M Carb; 3: sechs Tage in Sucrose gelagerte Membranen, ohne Effektor; 4: wie 3, + $10^{-4}$ M Carb. Die Experimente wurden ausgeführt wie in Fig. 6 beschrieben.

### 1.2.2 Untersuchung der Kinetik der agoniststimulierten Verschiebung des ($^3$H)TPMP$^+$-Photomarkierungsmusters

Die Dosis-Wirkungskurve der Photoreaktion von ($^3$H)TPMP$^+$ und der Delta-Kette des nAChR (Fig.11) deutet darauf hin, daß nicht Aktivierung, möglicherweise aber Desensitivierung mit der durch Agonisten induzierten Konformationsänderung, welche durch ($^3$H)TPMP$^+$-Markierung sichtbar gemacht werden kann, verbunden ist.
Die kinetische Untersuchung der Photoreaktion schien geeignet, genaueren Aufschluß über das Wesen der beobachteten Konformationsänderung zu geben, da die Halbwertszeiten bzw. Zeitkonstanten der Desensitivierung (s. Einleitung; (43; 9)) mit denen der Photoreaktion verglichen werden können.

#### 1.2.2.1 Verfolgung der Kinetik bei niedriger Carb-Konzentration

Bei niedriger Carb-Konzentration läßt sich die Kinetik des Radioaktivitätsanstiegs in der Deltakette mittels der für Photomarkierungsstudien im Gleichgewicht verwendeten UV-Lampe und mischen der Probe von Hand messen (Fig. 17).

Fig. 17. Zeitabhängigkeit der Carb-stimulierten Photoreaktion von ($^3$H)TPMP$^+$ und nAChR.- Rezeptormembranen wurden für verschiedene Zeiten mit $10^{-6}$ M Carb inkubiert; dann wurde 1 µM ($^3$H)TPMP$^+$ zugegeben und die Probe 30 sec später für 1 min UV-bestrahlt.-Die Carb-Vorinkubationszeiten betrugen: Spur 1: 0; Spur 2: 0,5; Spur 3: 1; Spur 4: 2; Spur 5: 5; Spur 6: 15; Spur 7: 30 min.

Noch nach 30-minütiger Vorinkubation der Rezeptormembranen mit $10^{-6}$ M Carb ist eine Zunahme der Radioaktivität in der Deltakette zu beobachten. Die Stimulierung des ($^{3}$H)TPMP$^{+}$-Einbaus erfolgt hier offensichtlich in einem -gegenüber dem Auftreten des desensitivierten Zustandes- sehr viel langsameren Zeitmaßstab. Die hierfür gemessenen Halbwertszeiten schwanken je nach experimentellen Bedingungen, liegen bei der hier gewählten Carb-Konzentration ($10^{-6}$ M) bei 1 min (43; s. A 1.4.2.1).- Bei höheren Agonist-Konzentrationen spielen sich die dynamischen Prozesse im Bereich von Millisekunden ab, können daher nur mit elektronischen Hilfsmitteln aufgelöst werden.

### 1.2.2.2 Auflösung der Photoreaktion in physiologischem Zeitmaßstab

#### 1.2.2.2.1 Vorstellung der Methode

Kombination einer stopped-flow-Apparatur mit einem gepulsten Hochenergielaser ermöglicht die Durchführung des Bestrahlungsexperiments innerhalb weniger Millisekunden. Die Konstruktion besteht aus folgenden Elementen (Fig. 18): Hochenergielaser, stopped-flow-Apparatur, Verzögerungsgenerator, Speicheroszilloskop. Der Hochenergielaser ist unverzichtbar; Versuche mit einem Excimerlaser verliefen negativ.

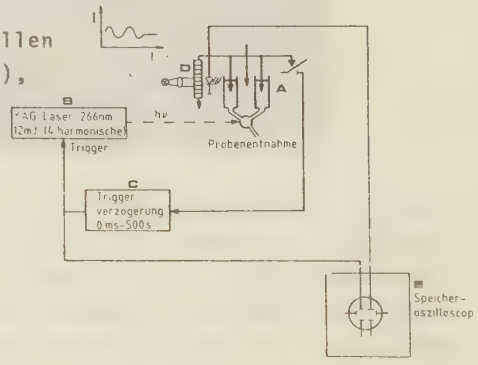



Fig. 18. Schematische Darstellung der Elemente des Versuchsaufbaus zur schnellen Photomarkierung (aus (100), nach A. Fahr).

1.2.2.2.2 Zeitabhängigkeit der Photoreaktion zwischen ($^3$H)TPMP$^+$ und dem nAChR bei verschiedenen Rezeptorzuständen

In Vorversuchen wurde sichergestellt, daß bereits ein einzelner Laser-Puls von ca. 12 mJ Energie und 4 nsec Dauer zu signifikantem ($^3$H)TPMP$^+$-Einbau in das Rezeptorprotein ausreicht (Fig. 19). Die verwendete Wellenlänge betrug 266 nm; das Wellenlängen-Optimum der Photoreaktion liegt bei 270 nm (s. Fig. 7).-

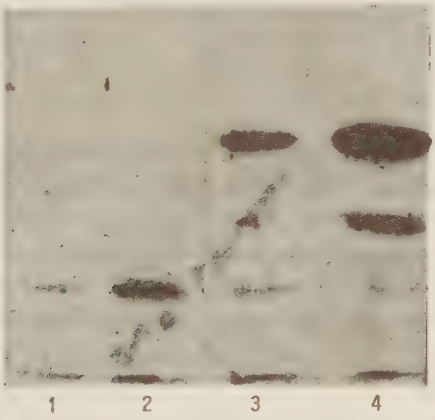



Fig. 19. Laserblitz- Photomarkierung des nAChR mit ($^3$H)TPMP$^+$. Rezeptormembranen wurden mit dem gleichen Volumen $2x10^{-4}$ M Carb/$10^{-6}$ M ($^3$H)TPMP$^+$ gemischt und der Laser zu bestimmten Zeiten nach der Mischung ausgelöst. Die Proben (ca. 30 µl) wurden entnommen und analysiert wie in Fig. 6 beschrieben. Die Verzögerungszeiten betrugen: Spur 1: 2,5 msec; Spur 2: 25 msec; Spur 3: 250 msec; Spur 4: 2500 msec.

Die Kinetik der Photoreaktion wurde für die Alpha- und die Delta-Kette genauer untersucht (Fig. 20).
Die Alpha- Kette wird schon 5 msec nach Mischung von Membranen und Liganden maximal photomarkiert; im zeitlichen Verlauf nimmt die eingebaute Radioaktivität evtl. etwas ab.

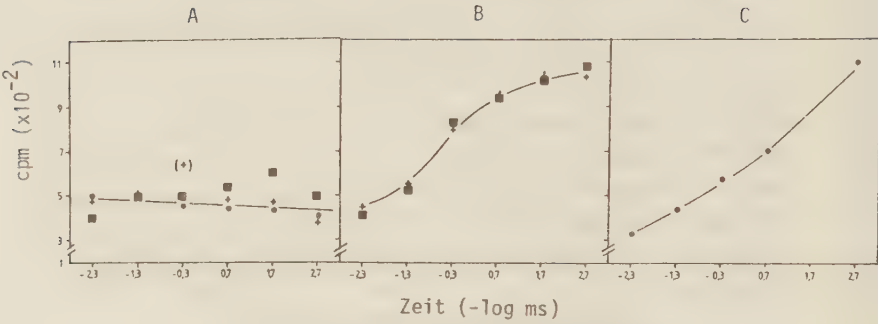



Fig. 20. Schnelle Photomarkierung des nAChR durch Bestrahlung mit einem Laserblitz.- Rezeptormembranen wurden mit ($^3$H)TPMP$^+$ und Carb (Endkonz. $10^{-6}$ bzw. $10^{-4}$ M) in der stopped-flow-Apparatur gemischt, bestrahlt, die Proben entnommen und elektrophoretisiert.-Die Alpha- und Deltabanden wurden ausgeschnitten und die enthaltene Radioaktivität gemessen. A: Zeitverlauf der Markierung der Alphakette. B: Zeitverlauf der Markierung der Deltakette. C: Zeitverlauf der Markierung der Deltakette nach Vorinkubation mit $10^{-4}$ M Carb (15 min, Raumtemp.). Die Laserbestrahlung erfolgte zu den auf der Abscisse angegebenen Zeiten nach der schnellen Mischung. •: Membranen wurden mit ($^3$H)TPMP$^+$ vorinkubiert. +: Membranen wurden gleichzeitig mit ($^3$H)TPMP$^+$ und Carb gemischt. ▪ : Membranen wurden mit Carb vorinkubiert.

In der Deltakette ist eine stetige Zunahme des Radioaktivitätseinbaus zu verzeichnen; die Halbwertszeit des agoniststimulierten Anstiegs bei in nativem Zustand belassenen Rezeptormembranen beträgt ca. 0,5 sec, bei durch Vorinkubation mit Carb desensitivierten Rezeptoren dagegen 4 sec (Fig. 20 B, C). Vorinkubation der Membranen mit 1 µM ($^3$H)-TPMP$^+$ hat keinerlei kinetische Veränderung zur Folge: man beobachtet auch hier den schnellen Anstieg der inkorporierten Radioaktivität (Fig. 20 B).

Interpretation der gefundenen Kinetiken des kovalenten ($^3$H)TPMP$^+$-Einbaus in die Alpha- bzw. Delta-Untereinheit des nAChR

1) Die Alpha-Kette wird bereits 5 msec nach Mischung der Rezeptormembranen mit den Effektoren maximal photomarkiert. Diese ($^3$H)TPMP$^+$-Bindungsstelle scheint demnach in allen beteiligten Rezeptorzuständen (R, A, I, D) vorhanden und leicht zugänglich zu sein (Fig. 20 A). Die schnelle Besetzung dieser Bindungsstelle reizt zu der Spekulation, daß ($^3$H)TPMP$^+$ den agoniststimulierten Ionenfluß aus rezeptorreichen Membranvesikeln (s. 28) von dieser Position aus blockieren könnte (s. auch Diskussion, Punkt 4).- Mit Sicherheit wird durch ($^3$H)TPMP$^+$ nicht die Bindungsstelle cholinerger Liganden photomarkiert, denn
a) beträgt die $K_D$ für Carb im Gleichgewicht $10^{-7}$ M und sollte daher bei der verwendeten Carb-Konzentration ($10^{-4}$ M) zu ca. 99,9 % besetzt sein.
b) Kompetition von TPMP$^+$ und ACh um die Agonistenbindungsstelle wird erst oberhalb von $10^{-4}$ M TPMP$^+$ beobachtet (28); bei den Photomarkierungsversuchen wurde lediglich $10^{-6}$ M ($^3$H)TPMP$^+$ verwendet.
Jedoch ist die kovalente ($^3$H)TPMP$^+$-Markierung der Alphakette durch Carb oberhalb $10^{-5}$ M teilweise, durch BTX vollständig zu blockieren (vgl. Fig. 11 bzw. Fig. 12).
2)Photomarkierung der Deltakette

Vorinkubation der Rezeptormembranen mit ($^3$H)TPMP$^+$ hat keinerlei Einfluß auf die gemessene Kinetik (Fig. 20 B). Die Bindung des Kanalliganden sollte demnach nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Radioaktivitätsanstiegs in der Deltakette darstellen, wenn ($^3$H)TPMP$^+$ zugleich mit dem Agonisten verabreicht wird.-Dieser Schluß wird durch die Beobachtung gestützt, daß TPMP$^+$ (1 mM) den Carb-stimulierten $^{22}Na^+$-Efflux momentan und vollständig blockieren kann (28).-Demnach wird bei gleichzeitger Applikation von ($^3$H)TPMP$^+$ und Carb durch die Photoreaktion eine Konformationsänderung des nAChR sichtbar gemacht und zeitlich verfolgt (Fig. 20 B). Ihre Bedeutung ist nicht völlig klar; sie tritt jedoch mit annähernd der gleichen Halbwertszeit auf wie der desensitivierte Zustand (0,5 sec; (38, 43)). Hinsichtlich der pharmakologischen Spezifität scheinen jedoch Unterschiede zu bestehen (s. Diskussion). Die etwa zehnfach längere Halbwertszeit des Radioaktivitätsanstiegs in der Delta-Kette bei bereits desensitiviertem Rezeptor könnte die Markierung eines weiteren Rezeptorzustandes reflektieren; jedoch liegen für die Existenz eines solchen keinerlei weitere Hinweise vor.
Licht auf die Bedeutung dieser langsamen Kinetik (Fig. 20 C). wirft vielleicht die die Interpretation der ($^3$H)PCP-Assoziationskinetik mit dem ruhenden und desensitivierten nAChR (30). Denn auch hier wurde eine schnelle Kinetik bei gleichzeitiger Zugabe mit PCP, eine langsame aber bei Vorinkubation mit Agonist beobachtet. Die Autoren interpretieren diese unterschiedlichen Assoziationsgeschwindigkeiten mit der diffusionskontrollierten, also schnellen, Bindung von PCP an den offenen Kanal, der langsamen Bindung abe an eine sterisch gehinderte Bindungsstelle bei infolge Desensitivierung geschlossenem Ionenkanal.-Bezogen auf die Photomarkierungskinetiken mit ($^3$H)TPMP$^+$ bietet sich analog die Interpretation der Verfolgung einer Konformationsänderung des Rezeptors infolge schnellen Bindens von ($^3$H)TPMP$^+$ an den offenen Kanal und nachfolgender Konformationsänderung

(d.h. Auftreten von Radioaktivität in der Delta- und evtl. Beta-Kette (s. hierzu B 1.2.1.4)) an. Bei desensitiviertem Rezeptor wäre die langsame Kinetik Ausdruck der langsamen Bindung von ($^3$H)TPMP$^+$ an die sterisch gehinderte Bindungsstelle nach bereits abgeschlossener Konformationsänderung.

Mit Sicherheit wird bei beiden Kinetiken die gleiche Bindungsstelle photomarkiert (Fig. 20 B u. C), da nur eine hochaffine ($^3$H)TPMP$^+$-Bindungsstelle pro Rezeptormolekül ($K_D$ = 1,5 µM in Anwesenheit von $10^{-5}$ M Carb) existiert (93). Möglicherweise existierende Bindungsstellen geringerer Affinität sollten bei der verwendeten ($^3$H)TPMP$^+$-Konzentration (1 µM) kaum besetzt, mit Sicherheit aber nicht mit gleicher Ausbeute (0,5%; der Radioaktivitätseinbau erreicht in beiden Fällen den gleichen Endwert, s. Fig. 20 B u. C) photomarkiert werden.

Als Hinweis auf die Beteiligung des geöffneten Ionenkanals, zumindest aber eines agonistspezifischen Rezeptorzustandes, kann die Beobachtung gewertet werden, daß die schnellere Kinetik des Radioaktivitätsanstiegs in der Deltakette (s. Fig 20 B) nur in Gegenwart von Agonisten zu beobachten ist. Antagonisten bewirken dagegen unabhängig von der Art der Zugabe (Vorinkubation bzw. zugleich mit ($^3$H)TPMP$^+$) immer eine langsame Kinetik des Radioaktivitätsanstiegs (50). Diese Stoffe öffnen den Ionenkanal nicht.-

## 1.3 Versuch der ($^3$H)TPMP$^+$-Markierung des nAChR aus Rattenmuskel

Im folgenden soll kuz der Versuch zur Anwendung der kovalenten Modifikation durch ($^3$H)TPMP$^+$ auf ein weiteres interessantes System vorgestellt werden.
Zur Zeit der Anfertigung dieses Teils der vorliegenden Arbeit herrschte einige Kontroverse um die molekulare Struktur des nAChR aus Vertebratenmuskel. Die Befunde lagen je nach Species zwischen drei (102), vier (103) und fünf (104) Untereinheiten; proteolytische Artefakte waren nicht auszuschließen.- Inzwischen scheint zumindest die Struktur des nAChR der Maus-Muskelzellinie BC 3 H-1 gesichert zu sein: es finden sich vier Untereinheiten von 42, 46, 48 und 60 kD (105).-
Schon seit einiger Zeit ist bekannt, daß Denervierung, d.h. Durchtrennung des Nervus ischiaticus, 10-20 Tage vor Entnahme des Unterschenkelmuskels von Ratten eine ca. zehnfache Erhöhung der extrasynaptischen Rezeptordichte nach sich zieht (106, 107, 108).- Diese Methode wurde auch im vorliegenden Fall angewandt, da selbst im günstigsten Fall nicht mehr als 1-2 nMol nAChR/g Protein zu erwarten sind. Dies würde bei der beschriebenen Photoreaktion bei einer Ausbeute von 0,5 % zu 100-200 cpm/250 µg Protein führen, dem Maximum der elektrophoretisch zu bewältigenden Menge.-
Fig. 21 zeigt ein Fluorogramm eines solchen Experiments. Da in Gegenwart und Abwesenheit eines hohen Überschusses von unmarkiertem TPMP$^+$ identische Markierungsmuster auftreten, liegen sämtlich unspezifische Reaktionen vor. Carb übt keinerlei Einfluß aus.- Es liegen mehrere Gründe für das Mißlingen dieses Experiments auf der Hand. Während in Torpedo-Membranen fast ausschließlich nAChR vorhanden ist, bildeter in der verwendeten Membranpräparation einen äußerst geringen Anteil; man befindet sich an der Nachweisgrenze. Auch ist unbekannt, ob der nAChR aus Muskel in seinem photochemischen Verhalten demjenigen aus Torpedo californica oder Torpedo marmorata ähnelt. Schließlich und vor allem

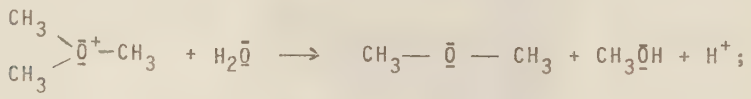
reagiert ($^3$H)TPMP$^+$ sehr viel unspezifischer als erhofft: es findet sich eine Vielzahl unspezifisch markierter Proteine. Dies bildet ein generelles Hindernis bei Photomarkierungsversuchen in Rohomogenaten (s. auch B 2.3).

Fig. 21. Photoreaktion von ($^3$H)TPMP$^+$ und Membranen aus denerviertem Rattenmuskel.- Membranen (250 µg Protein) wurden mit 2 µM ($^3$H)TPMP$^+$ in Gegenwart oder Abwesenheit von $10^{-4}$ M Carb 5 min lang bestrahlt, die Proben elektrophoretisiert und fluorographiert wie in Fig. 6 beschrieben.- Spur 1: ohne Effektor; Spur 2: + $10^{-4}$ M Carb; Spur 3: + 500 µM unmarkiertes TPMP$^+$; Spur 4: $^{14}$C-markierte Eichproteine.

## 1.4 Trialkyloxoniumionen als potentielle Kanalliganden des nAChR

### 1.4.1 Hintergrund

Trimethyloxonium ($TMO^+$)- Ionen wurden zur Modifikation des spannungsabhängigen $Na^+$- Kanals (109), der Acetylcholinesterase (110) und des nAChR (111) verwendet. In allen Fällen führte ihre Anwendung zur partiellen Inhibierung des Proteins.- Die Reaktion beruht auf Alkylierung nucleophiler Zentren, bevorzugt Carboxylgruppen. Dabei entstehen Methylester. In Konkurrenz hierzu läuft die Hydrolyse des Reagenz':



wobei diese aufgrund des hohen $H_2O$- Überschusses bei weitem überwiegt (112).-
Als besonders empfindlich gegen $TMO^+$ erwies sich die Bindung von Decamethonium, nicht aber Carb, an den nAChR . $Na^+$- Ionen schützten den Rezeptor vor Modifikation (111). Diese Befunde wurden als Hinweise darauf gewertet, daß nicht die cholinerge, sondern die vermutete zweite Bindungsstelle von Decamethonium am Rezeptor methyliert wird. Diese sollte,entsprechend der Größe des Liganden,10-12 Å von der Agonisten-Bindungsstelle entfernt sein.
Es wurde die Beteiligung einer Carboxylgruppe bei der Ionentranslokation durch den Ionenkanal des nAChR vorgeschlagen, da Protonen den agoniststimulierten Ionenfluß blockieren können (pK =4,8;(100)).
Der protektive Effekt von $Na^+$-Ionen gegen die Modifikation einer bestimmten Carboxylgruppe durch $TMO^+$ reizt zu der Spekulation, daß die vermutlich an der Ionentranslokation beteiligte Carboxylgruppe Substrat der Methylierung durch $TMO^+$ sein könnte. $TMO^+$ stellt somit ein denkbares Affinitätsreagenz einer wichtigen Ionenkanalkomponente dar.

### 1.4.2 Eigene Experimente

Die Halbwertszeit von $TMO^+$ in $H_2O$ beträgt ca. 2 Sekunden. Um signifikante Reaktionsausbeuten zu erhalten, muß ein erheblicher Oberschuß eingesetzt werden. Dies zieht Probleme bei der Pufferung nach sich (s. Hydrolyse- Gleichung). Da ein pH- Stat nicht zur Verfügung stand, wurden die Experimente in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4 oder 8,3) durchgeführt.

#### 1.4.2.1 $^{22}Na^+$- Efflux aus $TMO^+$-behandelten Rezeptormembranen

Zunächst wurde der Einfluß von $TMO^+$ auf den agonistischen stimulierten $^{22}Na^+$-Efflux aus rezeptorreichen Membranvesikeln (85) untersucht; er ist durch Vorinkubation der Vesikel mit 30 mM $TMO^+$ nicht blockierbar (Fig. 22).

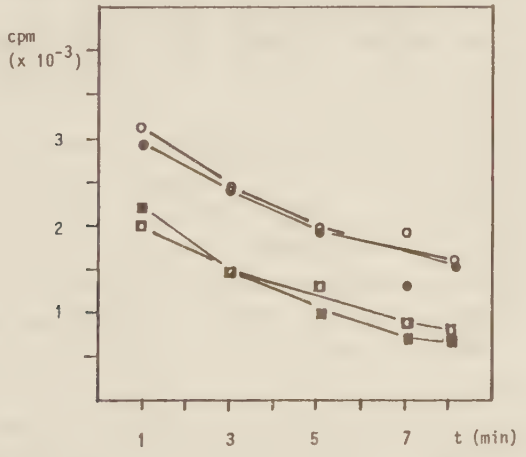



Fig. 22. $^{22}Na^+$-Efflux aus $TMO^+$-behandelten nAChR-reichen Membranvesikeln.- Diese wurden 12 h mit 20 µCi/ml $^{22}NaCl$ äquilibriert, sodann weitere 60 min mit 30 mM $TMO^+$ inkubiert und in das hundertfache Volumen isotoner Lösung, die $10^{-5}$ M Carb enthielt, verdünnt. In Minutenabständen wurden Aliquots filtriert und die zurückgehaltene Radioaktivität im Scintillationszähler bestimmt.

Dies ist nicht verwunderlich, da nur mehr oder weniger vollständige Blockierung aller Ionenkanäle zu deutlicher Abnahme der $^{22}Na^+$- Efflux- Rate führen würde.

### 1.4.2.2. Acetylcholin-Bindung an $TMO^+$-modifizierten Membranen

Als empfindlicherer Parameter wurde die Acetylcholinbindung an nativen und $TMO^+$- sowie $TEO^+$- (Triethyloxonium-) behandelten Membranen untersucht (Fig. 23).
Der Effekt der Hydrolyseprodukte der Reagenzien wurde ebenfalls überprüft, da die relativ hohe Ether- bzw. Alkoholkonzentration, wie auch geringe pH- Wertänderung die Ligandenbindung beeinträchtigen können.-
Dies ist der Fall; jedoch ist durch das aktive Reagenz Blockierung weiterer Bindungsstellen möglich.
$TEO^+$ ist insgesamt aktiver als $TMO^+$. Die $K_D$ für ($^3$H)ACh wird nicht beeinflußt.-

### 1.4.2.3 ($^3$H)$TPMP^+$-Bindung an $TEO^+$-modifizierten Membranen

($^3$H)$TPMP^+$ wurde als Ionenkanalblocker vorgestellt (s. B 1.1.2). Kanalliganden scheinen ihre Wirkung zumindest zum Teil durch sterische Interaktion mit dem Ionenkanal zu entfalten.- Es erschien daher sinnvoll, den Einfluß der $TEO^+$-Modifizierung des nAChR auf die ($^3$H)$TPMP^+$-Bindung zu untersuchen.- $TEO^+$ inhibiert die Bindung des Kanalliganden an durch $10^{-4}$ M Carb desensitivierte Rezeptoren deutlich (Fig. 24). Jedoch zeigen auch die in gleicher Konzentration eingesetzten Hydrolyse-Produkte Wirkung.-
Die Interpretation der vorgestellten Ergebnisse (Fig. 22, 23,24) ist aus mehreren Gründen schwierig.- Die starke Interferenz der $TMO^+$- bzw. $TEO^+$-Hydrolyseprodukte mit der ($^3$H)ACh- und ($^3$H)$TPMP^+$-Bindung beweist den teilweise unspezifischen

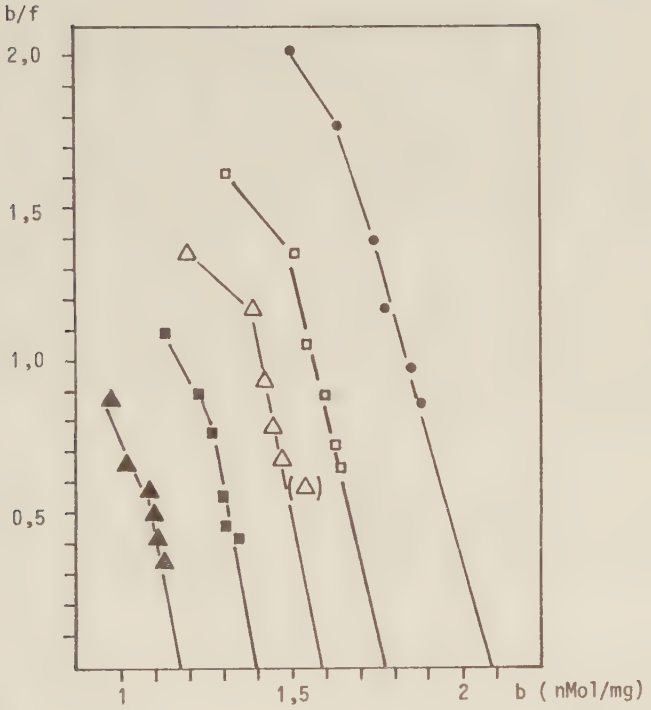



Fig. 23. ($^3$H)ACh-Bindung an nativen und $TMO^+$- bzw. $TEO^+$-modifizierten Membranen.- Diese wurden mit $10^{-4}$ M Eserin und verschiedenen Konzentrationen ACh inkubiert und die freie Ligandenkonzentration durch einen Ultrazentrifugationstest bestimmt. ● : native Membranen; ■,□ : Membranen wurden mit 30 mM $TMO^+$ (■) bzw. dem Hydrolysat (□) vorinkubiert; △,▲ : Membranen wurden mit 30 mM $TEO^+$ (▲) bzw. dem Hydrolysat (△) vorinkubiert.

Charakter dieser Effekte. Zudem ist die Signifikanz des verbleibenden Anteils der Inhibierung schwer zu beurteilen, da die Ether-Konzentration im Hydrolysat aufgrund der Flüchtigkeit dieser Verbindungen deutlich geringer ist als bei direkter Anwendung des Reagenz'. Dieses muß zudem wegen seiner raschen Hydrolysierbarkeit als Feststoff zugegeben werden, was lokal zu sehr viel höherer Konzentration der Zersetzungsprodukte und damit verbundener irreversibler Denaturierung von Rezeptoren führen kann.- Der direkte Nachweis kovalenter Modifikation von Rezeptorprotein durch $TMO^+$ oder $TEO^+$ ließ sich nicht erbringen, da Fachleute die radioaktive Markierung dieser Verbindungen wegen deren Instabilität für undurchführbar hielten.- Von einer weiteren Bearbeitung dieses Projekts wurde abgesehen.

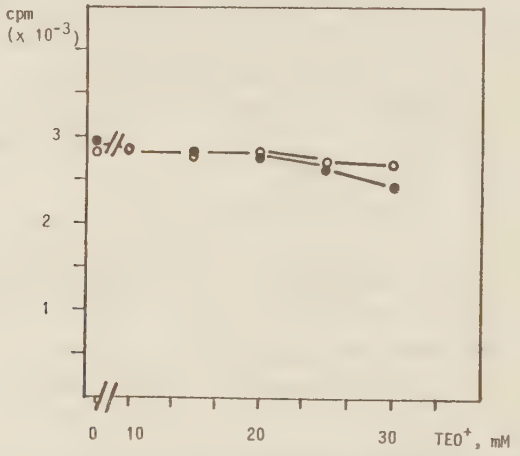



Fig. 24. Einfluß von $TEO^+$ auf die ($^3$H)$TPMP^+$-Bindung an den nAChR.- Rezeptormembranen wurden mit $TEO^+$ bzw. den Hydrolyseprodukten (30 mM jeweils; Membranen in 100 mM $Na/PO_4$, pH 8,3, Proteinkonz. 0,5 mg/ml) 2 h bei Raumtemp. inkubiert. Dann wurde der pH-Wert, sofern nötig, auf 7,4 eingestellt, die Proben 1:1 mit 100 mM $Na/PO_4$ verdünnt, 30 min bei Raumtemp. mit ($^3$H)$TPMP^+$ inkubiert und die filtrierbare Radioaktivität gemessen. Als spezifische Bindung wurde der durch 1 mM $TPMP^+$ verdrängbare Anteil bezeichnet.

## 1.5 Diskussion der Ergebnisse

$(^3H)TPMP^+$ ist ein Kanalblocker (28) und ein Photoaffinitätsreagenz des nAChR.
Agonisten, in geringerem Ausmaß Antagonisten, nicht aber Alpha-Toxine erhöhen die Affinität des nAChR für $(^3H)TPMP^+$ und stimulieren damit die Bindung des Kanalliganden.
Qualitativ und quantitativ identische Effektorspezifität besitzt die Stimulierung der Photomarkierung der Beta- und Deltakette; diese kann demnach als Spiegel der Stimulierung der $(^3H)TPMP^+$-Gleichgewichtsbindung betrachtet werden.
Das Ausbeute-Maximum der Photoreaktion liegt bei 270 nm; bei dieser Wellenlänge besitzt das $TPMP^+$-Absorptionsspektrum ein relatives Minimum (Fig. 7). Hieraus kann auf Anregung einer Proteinkomponente, möglicherweise eines aromatischen Aminosäurerests, als notwendige Voraussetzung der Photomarkierung geschlossen werden. Den gleichen Schluß legt die Beobachtung nahe, daß der Radioaktivitätseinbau nur bei Rezeptor der Species Torpedo marmorata, nicht aber Torpedo californica, durch cholinerge Liganden stimulierbar ist (Fig. 8, 9).
Die effektorstimulierte Photomarkierung der Delta- und Betakette wird als sichtbarer Ausdruck von durch cholinerge Liganden induzierten Konformationsänderungen interpretiert. Über deren Bedeutung sollte eine Reihe von Experimenten Aufschluß geben, insbesondere die Untersuchung ihrer Effektorspezifität (Fig. 1-16) und ihres zeitlichen Verlaufs (Fig. 17, 19, 20).- Folgende Aussagen sind möglich:
1) Agonisten stimulieren die kovalente $(^3H)TPMP^+$-Inkorporation in den nAChR. Keinesfalls ist hierfür die Aktivierung des Ionenkanals verantwortlich, denn
a) halbmaximale Stimulierung des Ionenflusses bedarf mehr als einer Größenordnung höherer Agonist-Konzentration (48, 96). Hingegen entspricht die $EC_{50}$ der Photoreaktion (Ligandenkonzentration, die 50%igen Effekt auslöst) leidlich der für die Desensitivierung gemessenen ($10^{-7}$ M Carb).
b) der zeitliche Verlauf der Stimulierung der $(^3H)TPMP^+$-Inkorporation bei gleichzeitiger Zugabe von Agonist und

und Radioligand entspricht in keinem Falle dem Zeitmaßstab der Aktivierung des Ionenkanals. Dieser Prozeß erfolgt im Submillisekundenbereich (9, 47), während die durch ($^3$H)TPMP$^+$ markierte Rezeptorkonformation erst ca. 10 ms nach Mischung von Membranen und Liganden aufzutreten beginnt (Fig. 20 B). Dieser Zeitmaßstab scheint vielmehr mit dem Auftreten des desensitivierten Zustandes vergleichbar zu sein, denn beide Prozesse besitzen bei ähnlicher Agonist-Konzentration Halbwertszeiten von ca. 0,4 sec (vgl. Fig 20 B u. (43); s. auch A 1.4.2.1).

2) Phospholipaseaktivität und Altern des Membranpräparats können zur Desensitivierung des nAChR führen ((98, 99) bzw. (36)).- Lipase $A_2$ und Alterung der Membranen bewirken auch in Abwesenheit cholinerger Effektoren die Stimulierung der kovalenten ($^3$H)TPMP$^+$-Inkorporation in die Beta- und Deltakette des nAChR (Fig. 13 bzw. 16). Diese Parallelität läßt an Desensitivierung als Äquivalent der durch die Photoreaktion sichtbar gemachten Konformationsänderung denken.

3) Die Interpretation der unterschiedlichen Zeitskalen der Photoreaktion von ($^3$H)TPMP$^+$ und nAChR bei ruhendem und desensitiviertem Rezeptorzustand (Fig. 20 B u. C) ist spekulativ. Sie wurde in Analogie zur Interpretation der ($^3$H)PCP-Bindungskinetiken an den nAChR vorgenommen (30) (s. B 1.2.2.2.2).
Bei gleichzeitiger Applikation von ($^3$H)TPMP$^+$ und Agonist würde der Kanalblocker diffusionskontrolliert (d.h. schnell) an den offenen Kanal binden und ihn dabei blockieren.- Zu diesem Zeitpunkt wird nur die Alpha-Polypeptidkette photomarkiert (Fig. 20 A). Erst sehr viel später (nach 10 msec) beginnt die durch den Radioaktivitätsanstieg in der Deltakette markierte Rezeptorkonformation aufzutreten (Fig. 20 B). Der sehr viel langsamere Radioaktivitätsanstieg bei desensitiviertem Rezeptor könnte den Prozeß der langsamen Bindung des Kanalliganden an seine sterisch gehinderte Bindungsstel-

le nach bereits abgeschlossener Konformationsänderung reflektieren (Fig. 20 C).-
Aufschlußreich für die Interpretation der beiden Photoreaktionskinetiken (Fig. 20 B u. C) sowie der Bedeutung des photomarkierten Rezeptorzustandes insgesamt wäre die zeitlich aufgelöste Messung der reversiblen ($^3$H)TPMP$^+$-Bindung an den ruhenden und desensitivierten Rezeptor und der Vergleich der so erhaltenen kinetischen Konstanten mit denjenigen der Desensitivierungskinetik des Rezeptors in Gegenwart von $10^{-6}$ M TPMP$^+$ und $10^{-4}$ M Carb. Als Methode der Wahl bietet sich die quenched-flow-Technik an (42, 43, 96).

4) Interessanterweise wird zum Zeitpunkt bereits erfolgter Blockade des Ionenkanals nur die Alpha-Untereinheit photomarkiert (Fig. 20 A). Dies könnte gleichbedeutend sein mit der sterischen Blockierung des Ionenkanals von dieser Polypeptidkette aus. Fragwürdig wird diese Spekulation jedoch dadurch, daß photoreaktive Aminosäurereste möglicherweise erst durch Konformationsänderungen des Rezeptors in sterisch günstige Positionen gelangen und nur so die Photomarkierung weiterer Untereinheiten ermöglichen.- Über die Identität dieser ($^3$H)TPMP$^+$-Bindungsstelle auf der Alpha-Untereinheit ließe sich weiter spekulieren. Im Ruhe- wie desensitivierten Zustand existiert nur eine hochaffine ($^3$H)TPMP$^+$-Bindungsstelle pro Rezeptormolekül (93). Sollte also die Photomarkierung der Alpha-Kette im Ruhe- und aktivierten Zustand (bis ca. 10 ms nach Mischung der Effektoren) und die erst später einsetzende Markierung der Delta- und(wahrscheinlich)Betakette Bestandteile ein und derselben ($^3$H)TPMP$^+$-Bindungsstelle identifizieren? Oder existieren mehrere voneinander unabhängige Bindungsstellen? Eine Entscheidung ist derzeit nicht möglich, wenngleich die zweite Alternative wegen der Existenz nur einer hochaffinen Bindungsstelle unwahrscheinlich ist.- Folgende Oberlegung macht die erste Möglichkeit besonders interessant: die zunehmende radioaktive

Markierung der Beta- und Deltakette könnte eine räumliche Annäherung der Beta- Delta- und Alphakette reflektieren, die vielleicht den molekularen Mechanismus der Inaktivierung des Ionenkanals darstellt.- Gleichwohl ist die genaue Untersuchung der ($^3$H)TPMP$^+$-Gleichgewichtsbindung oberhalb "der" $K_D$ geboten; dies gilt auch für den folgenden Aspekt.

5) Die Identität der Gleichgewichtsbindungsstelle mit dem Ort der kovalenten Reaktion ist aufgrund der identischen Effektorspezifität der reversiblen und irreversiblen ($^3$H)TPMP$^+$-Bindungsstimulierung wahrscheinlich. Weiterhin besitzen beide Prozesse identische Carb- Dosis-Wirkungs-Kurven (Fig. 11). Schließlich existiert nur eine nochaffine ($^3$H)TPMP$^+$-Bindungsstelle pro Rezeptormolekül ($K_D$= 13 µM in Abwesenheit bzw. 1,5 µM in Anwesenheit von $10^{-5}$ M Carb (28)); nur diese sollte bei der verwendeten ($^3$H)TPMP$^+$-Konzentration ($10^{-6}$ M) besetzt werden.
Ein weiteres Argument für die Identität der Gleichgewichtsbindungsstelle mit dem Ort der Photoreaktion folgt.

6) Lokalanästhetika können die kovalente ($^3$H)TPMP$^+$-Markierung verhindern (Fig. 10).- Triton X-100, das unterhalb seiner cmc lokalanästhetikaähnliche Eigenschaften besitzt, verdrängt ($^3$H)TPMP$^+$ aus seiner Gleichgewichtsbindungsstelle (93); ($^3$H)PCP ist durch TPMP$^+$ verdrängbar (28).- ($^3$H)TPMP$^+$ bindet demnach an die Lokalanästhetikabindungsstelle und reagiert von dort aus kovalent mit dem Rezeptor.- Eine noch überzeugendere Demonstration der Identität der photochemisch markierten mit der Lokalanästhetikabindungsstelle wäre die Blockierbarkeit letzterer durch die hochspezifischen Kanalblocker PCP und HTX. Diese Liganden standen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung.

7) Der Nachweis einer direkten sterischen Blockade des Ionenkanals durch ($^3$H)TPMP$^+$ steht aus.- Allerdings ist die direkte Interaktion des Blockers mit dem Ionophor wahrscheinlich (s. B 1.1.2), denn

a) die augenblickliche Blockierung des $^{22}Na^+$-Efflux kann kaum hinreichend mit der Beschleunigung der Desensitivierung infolge Interaktion von $(^3H)TPMP^+$ mit der allosterischen Bindungsstelle erklärt werden.- Gleichwohl wäre der Vergleich der Desensitivierungsgeschwindigkeit und der Blockierungsgeschwindigkeit des Ionophors in Gegenwart von $10^{-6}$ M $TPMP^+$ und $10^{-4}$ M Carb sehr aufschlußreich (s. Punkt 3 der Diskussion).
b) die kovalente Markierung dee nAChR durch $(^3)TPMP^+$ wird durch Lokalanästhetika, die mit Sicherheit sterisch mit dem Ionenkanal interagieren (32), verhindert (Fig. 10).

8) Während alle bisher diskutierten Beobachtungen mit dem Vierzustandsmodell kompatibel sind, ergeben sich im Zusammenhang mit der Interpretation der Stimulierbarkeit der reversiblen und irreversiblen $(^3H)TPMP^+$-Bindung an den nAChR durch Antagonisten Schwierigkeiten.
Im Vierzustandsmodell wird ihre pharmakologische Wirkung molekularmechanistisch primär durch Stabilisierung des Ruhezustandes des nAChR (R) erklärt (9, 13).
Tatsächlich besetzen Agonisten und Antagonisten die gleichen Bindungsstellen, letztere bewirken jedoch nicht die Öffnung des Ionenkanals.
Eine Anzahl mit verschiedenen Methoden gewonnener Daten läßt sich jedoch nicht mit der Stabilisierung des Ruhezustandes durch Antagonisten erklären:
a) Agonisten und Antagonisten, nicht jedoch Alpha-Toxine, stimulieren die Gleichgewichtsbindung der Kanalblocker $(^3H)TPMP^+$ (28), $(^3H)PCP$ (27, 30), $(^3H)H_{12}$-HTX (25,41) und anderer in für jeden cholinergen Liganden spezifischen Ausmaßen.
b) Agonisten und Antagonisten, nicht jedoch Alpha-Toxine, stimulieren den kovalenten Einbau der Kanalliganden $(^3H)$Chlorpromazin, $(^3H)PCP$, $(^3)$Trimethisoquin (22) und $(^3H)TPMP$ (118) in den nAChR in für jeden cholinergen Liganden spezifischen Ausmaßen.
c) Agonisten und Antagonisten, nicht aber Alpha-Toxine, intensivieren die Fluoreszenz des Kanalliganden Quinacrin in für jeden Effektor spezifischer Quantität (40). Ähn-

liches gilt für die pharmakologisch nicht getestete Verbindung Ethidium (119).

d) Agonisten und einige Antagonisten desensitivieren den nAChR in für den jeweiligen Effektor spezifischen Ausmaßen. Insbesondere Hexamethonium erhöht die Affinität des Rezeptors für Agonisten (36, 37, 113). Während gleiches für d-Tubocurarin bei der Species Torpedo californica beobachtet wurde, scheint dies nicht für den nAChR der Species Torpedo marmorata zu gelten (36). Flaxedil besitzt keinerlei desensitivierende Wirkung.-

Besonders relevant für die Diskussion der vorgelegten Ergebnisse ist der Quinacrin-Fluoreszenztest (s. Punkt 8 c), da mit ($^3$H)TPMP$^+$ wie Quinacrin Kanalblocker als "Monitoren" von Konformationsänderungen des Rezeptors dienen.

Bei beiden Methoden wird qualitativ und quantitativ die gleiche Effektorspezifität beobachtet. In beiden Fällen induzieren alle getesteten Antagonisten Konformationsänderungen des nAChR; Flaxedil desensitiviert den nAChR nicht, wohl aber induziert es eine -wenn auch geringe- Konformationsänderung.

Die durch Flaxedil stabilisierte und durch Photomarkierung mit ($^3$H)TPMP$^+$sichtbar gemachte Rezeptorkonformation wurde deshalb als antagonistenspezifischer Zustand bezeichnet (50, 100). Die funktionelle Bedeutung dieses Zustands ist unklar.

Durch d-Tubocurarin induzierte Konformationsänderungen sind zumindest partiell, auf Interaktionen nicht nur mit der Agonistenbindungsstelle zurückzuführen.

Aufgrund elektrophysiologischer Studien erscheint d-Tubocurarin als gemischt kompetitiv-nichtkompetitiver Antagonist (s. (100)).

Während in detaillierten Bindungsstudien an Torpedo-Rezeptor-Membranen d-Tubocurarin keinerlei Affinität für die Lokalanästhetika-Bindungsstelle zeigte (114), wurde Kompetition

von d-Tubocurarin (oberhalb $10^{-5}$ M) und ($^3$H)$H_{12}$-HTX (2 nM) um gemeinsame Bindungsstellen beobachtet (115).
Die desensitivierende Wirkung des Antagonisten Hexamethonium wurde durch seine Ähnlichkeit mit "metaphilischen" Antagonisten (z.B. Dinaphtyldecamethonium (120)) begründet (36). Diese Verbindungen scheinen auch lokalanästhetikaartige Wirkungen zu besitzen.- Ob dies allerdings für Hexamethonium zutrifft, ist sehr zweifelhaft (s. nächsten Absatz).

Zusammenfassend läßt sich feststellen:
Agonisten und Antagonisten können Konformationsänderungen des nAChR induzieren.-Zumindest Flaxedil induziert einen von den ruhenden, aktiven und desensitivierten unterschiedenen Zustand, der antagonistenspezifischer Zustand genannt werden kann.

Im Vierzustandsmodell (s. Einleitung) wird die pharmakologische Wirkung von Liganden des nAChR durch Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den vorgeformten Zuständen erklärt.
Sowohl die Quinacrin-Fluoreszenzdaten (40) wie die unterschiedliche Stimulierbarkeit der reversiblen und irreversiblen Bindung von Kanalblockern durch cholinerge Effektoren sprechen gegen die Existenz eines einzigen, durch alle Agonisten bzw. Antagonisten stabilisierten Zustandes.
Vielmehr bewirkt jeder Ligand einen für ihn spezifischen Signalanstieg, dem eine spezifische Konformationsänderung zugrunde liegen sollte.- Diese effektorspezifischen Konformationsänderungen lassen sich sehr viel einfacher durch ein 'induced fit'- als ein Gleichgewichtsmodell mit vier vorgeformten Zuständen erklären (s. A 1.4.2.1).
Ein 'induced fit-'Modell könnte darüber hinaus die unterschiedliche Wirkung von Agonisten und kompetetiven Antagonisten leichter verständlich machen: beide Effektor-Klassen besetzen die gleichen Bindungsstellen, bewirken qualitativ ähnliche Konformationsänderungen, Agonisten jedoch in stärkerem Ausmaß, sodaß der Ionenkanal sich öffnet.
Hierfür spricht, daß der Antagonist Hexamethonium durch Re-

duktion einer Disulfidbrücke des nAChR zum Agonisten wird (116). Decamethonium wirkt in einigen Systemen als Agonist, in anderen antagonistisch (117). D-Tubocurarin kann ebenfalls als Agonist wirken (121, 122).- Die Trennungslinie zwischen den genannten Effektorklassen verläuft also fließend, je nach molekularer Eigenart des untersuchten nikotinischen Acetylcholinrezeptors.-

Trialkyloxoniumionen erwiesen sich wegen ihrer extremen Instabilität und der mit der Membran interferierenden Hydrolyseprodukte als nur bedingt geeignete Ionenkanalsonden (Fig. 22-24). Die beobachteten Blockierungseffekte konnten nicht eindeutig einer kovalenten Modifikation zugeschrieben werden.

## 2. Dopaminrezeptoren im Zentralnervensystem höherer Säuger

### 2.1 Einführung

Im ZNS existieren im wesentlichen drei Systeme dopaminerger Bahnen, die kurz vorgestellt werden sollen.- Auch in anderen Bereichen des ZNS finden sich Dopaminrezeptoren, jedoch in ca. zwanzigfach geringerer Konzentration, des weiteren in peripheren Geweben, z.B. der Nebenschilddrüse, den Nieren- und Mesenterialarteriolen und anderen.

#### 2.1.1 Lokalisierung dopaminerger Bahnen und ihre möglichen Funktionen

Eine Obersicht findet sich in Fig. 25.

##### 2.1.1.1 Das Tuberoinfundibularsystem

Hypothalamische Peptide bewirken im Hypophysen-Vorderlappen (HVL) die Ausschüttung einer Reihe von Hormonen.- Dopamin wirkt inhibitorisch auf die Prolactin- Freisetzung; vermutlich wird es aus dopaminergen Neuronen des Tuberoinfundibularsystems ausgeschüttet und gelangt über die Blutbahn in den HVL (124). Hier befinden sich ausschließlich Dopaminrezeptoren des $D_2$-Typs, weshalb zu ihrer Charakterisierung oft HVL-Membranpräparate benutzt werden (125;52). Auch an Primärkulturen dieses Organs wurden Untersuchungen durchgeführt (126).-

##### 2.1.1.2 Das nigrostriatale System

Dieses System dopaminerger Neuronen ist an der Kontrolle von Haltung und motorischen Funktionen beteiligt.- Diesbezügliche Evidenzen stützen sich primär auf Krankheitsbilder nach Läsion bzw. Degeneration nigrostriataler Neurone.- Hornykiewicz beschrieb einen starken Mangel an biogenen Aminen, insbesondere Dopamin, in post-mortem-Hirnen von an Morbus Parkinson erkrankten Patienten (127).

Der Mangel an Transmitter geht mit dem Verlust von Nervenzellen des nigrostriatalen Systems einher.- Der Versuch, durch Medikation mit (3,4)Dihydroxyphenylalanin normale Dopaminkonzentrationen im ZNS wiederherzustellen, gelang nur teilweise.-
Man suchte nach geeigneten "Parkinsonismus"-Tiermodellen. Chemische Läsion mit 6-Hydroxydopamin (OHDA) führt bei Ratten zu "Supersensitivität" gegen dopaminerge Agonisten (128), hervorgerufen möglicherweise durch erhöhte Rezeptordichte nach Läsion (129).
Als sehr viel interessanter scheint sich die Verbindung N-Methyl-4-Phenyl-(1,2,3,6)Tetrahydropyridin (MPTP) zu erweisen; sie ruft bei Mensch und Tier parkinsonismusähnliche Symptome hervor, verbunden mit selektiver Degeneration dopaminerger Neuronen der Substantia nigra und noradrenerger Neuronen des Locus coeruleus. Die gleichen Defekte wurden an Hirnen verstorbener Parkinsonismus-Patienten beobachtet (130).- Bei dem MPTP-"Rezeptor" dürfte es sich um Monoaminooxidase (MAO) B handeln (131); autoradiographische Studien belegten die identische Lokalisierung beider (132). Verabreichung von MAO-Blockern (Pargylin, Deprenil u.a.) hemmt die Bildung des toxischen Metaboliten 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium ($MPP^+$) aus MPTP und verhindert im Tierversuch das Auftreten von Symptomatik (130). Die Ursache der Cytotoxizität ist unbekannt; beobachtet wurde jedoch eine starke Abnahme synaptosomalen Dopamins nach Behandlung mit MPTP. Da andere Hirnbereiche ebenfalls $MPP^+$ anreichern ohne daß Läsionen auftreten (133), könnte man an die spezifische Inhibierung dopaminerger Stoffwechselwege und damit verbundene Degeneration von Neuronen denken.-

### 2.1.1.3 Das mesocorticale System

Dieses System dopaminerger Neuronen ist möglicherweise an der Modulation affektiver Reize und von Gedächtnisinhalten beteiligt, indem es die Aktivität von Neuronen, die vom Hippocampus zum Cortex ziehen, beeinflußt (123).-
Da antipsychotische Drogen als Antagonisten an zentralen

Dopaminrezeptoren wirken, wurde in der klinischen Forschung "Überreaktivität" des dopaminergen Systems mit der Ätiologie der Schizophrenie in ursächlichen Zusammenhang gebracht. Dem Begriff der Supersensitivität wurde tatsächlich der Nachweis einer signifikanten Rezeptorzahl-Erhöhung in den Hirnen verstorbener Schizophrener an die Seite gestellt (134, 135). Im übrigen existiert eine gute Korrelation zwischen klinischer Potenz der Neuroleptica und ihrer Rezeptoraffinität. Dopaminerge Agonisten wie Lysergsäurediethylamid (LSD) können schizophrenieartige Symptome erzeugen. Eine genetische Komponente wird vermutet (123).- Die Beteiligung des mesocorticalen Systems an der Ätiologie der Schizophrenie beruht mehr oder weniger auf Spekulationen und stützt sich auf die symptomatische Ähnlichkeit gewisser psychomotorischer Epilepsien und "der" Schizophrenie.- Die"Dopaminhypothese" ist umstritten: Neurolepticabindung an Dopaminrezeptoren erfolgt schnell nach oraler Applikation; die Symptome verlieren sich aber im Zeitraum von Wochen. Außerdem wird durch Neuroleptica die Restsymptomatik in keiner Weise beeinflußt.

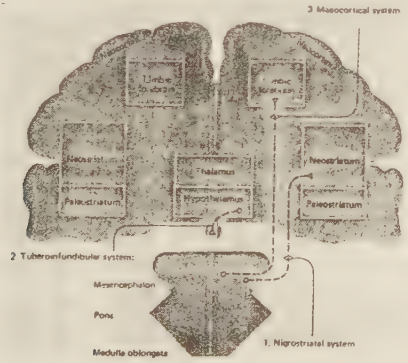



Fig. 25. Schematische Darstellung der bedeutensten dopaminergen Systeme im ZNS (aus (123)).

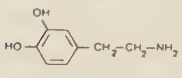
## 2.1.2 Multiple Dopaminrezeptoren

Im ZNS existieren verschiedene Dopaminrezeptortypen, die sich sowohl in ihren pharmakologischen Charakteristica wie ihrer biochemischen Aktionsweise unterscheiden. Am besten

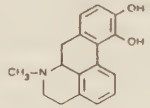
charakterisiert sind der $D_1$- und $D_2$-Rezeptortyp. Daneben findet sich in der Literatur auch die Beschreibung von $D_3$- und $D_4$- Subtypen sowie der Benzamid- Bindungsstelle (52); ihre Bedeutung ist unklar (s.u.).
Agonisten wie Antagonisten der Dopaminrezeptoren (DAR) gehören verschiedenen Stoffklassen an. Dissoziationskonstanten und Spezifitäten sind in Tab. 2 aufgelistet.

Agonisten

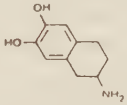
1) Catecholaminderivate



Dopamin

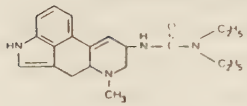


Apomorphin

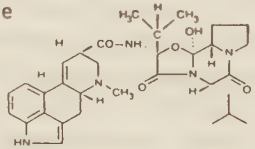


ADTN((6,7Dihydroxy)-2-Amino-tetralin)

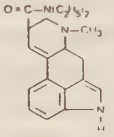
2)Ergot-Derivate



Lisurid



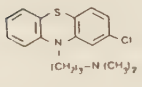
Bromocryptin



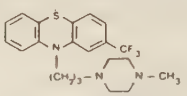
Lysergsäurediethylamid (LSD)

Antagonisten

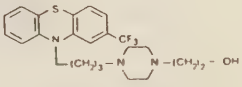
1) Phenothiazine



Chlorpromazin

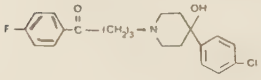


Trifluorperazin

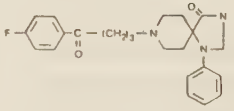


Fluphenazin

2) Butyrophenone

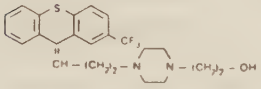


Haloperidol



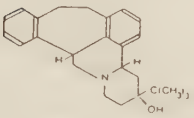
Spiroperidol

3) Thioxanthene

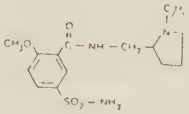


cis-Flupenthixol

4) (+)Butaclamol



5) Sulpirid (Benzamid)



2.1.2.1 Der $D_1$- Rezeptor und die Stimulierung der Adenylatcyclase

Eine dopaminsensitive Adenylatcyclase wurde zunächst im Rückenmark, später auch im ZNS nachgewiesen (78,79). Man beobachtete eine gute Korrelation zwischen der Cyclase- Inhibition in vitro und der antipsychotischen Wirkung verschiedener Phenothiazinderivate (136); Butyrophenone waren jedoch, verglichen mit ihrer klinischen Wirkung, zu schwache Antagonisten (137). Dies führte 1979 zur Beschreibung zweier Rezeptor-Kategorien, $D_1$ und $D_2$ (138). Der $D_1$-Prototyp ist in der Nebenschilddrüse lokalisiert, wo Dopamin(DA) cAMP-Synthese und Parathormonfreisetzung stimuliert .- Auch im ZNS fand sich eine hochaffine Thioxanthen-Bindungsstelle, die durch Kompetitionsstudien als $D_1$-Rezeptor identifiziert wurde; die Funktion ist unbekannt. Problematisch für die biochemische Charakterisierung ist das Fehlen eines geeigneten Liganden; das generell verwendete ($^3$H)Flupenthixol hat einen unspezifischen Bindungsanteil von über 60%, bindet zudem auch hochaffin an den $D_2$-Rezeptor. Dieser kann jedoch durch geeignete Butyrophenonkonzentrationen "maskiert" werden. Unter diesen Bedingungen verläuft die ($^3$H)Flupenthixol-Verdrängungskurve durch Agonisten biphasisch und kann durch GTP nach zu höheren Agonistkonzentrationen verschoben werden, was man für einen cyclasestimulierenden Rezeptor erwartet.

2.1.2.2 Der $D_2$-Rezeptor

Er ist wesentlich besser charakterisiert als der $D_1$-Rezeptor, da mit ($^3$H)Spiroperidol (Spi) ein hochaffiner Ligand ($K_D$= 0.09 nm) mit geringem unspezifischen Bindungs-

| | $D_1$ | $D_2$ | $D_3$ | $D_4$ | Benzamid-Bindungsstelle |
|---|---|---|---|---|---|
| Phenothiazine ($K_D$) | nM | nM | nM | nM | - |
| Thioxanthene ($K_D$) | nM | nM | nM | nM | - |
| Butyrophenone ($K_D$) | µM | nM | µM | nM | nM |
| Benzamide($K_D$) (Sulpirid) | ( 10µM) | 100-1000nM | 100µM | nM | nM |
| Agonisten ($K_D$) | µM | nM | nM | µM | nM |
| Inhibierung der Agonisten-Bindung durch GTP | ja ($IC_{50}$ unklar) | ja ($IC_{50}$ ca.100µm) | ja ($IC_{50}$ ca.10µm) | ? | ja |
| Cyclase-Kopplung | stimulierend | inhibierend (?) | ? | ? | - |
| $Me^{2+}$-Effekt auf Agonisten-Bindung | stimulierend | dito | dito | - | - |
| $Me^{+}$-Effekt auf Agonisten-Bindung | ? | inhibierend | ? | - | - |
| Konzentration (pro mg Membranprotein) | 600-2000fMol | 250-700 fMol | 50-700 fMol | - | - |
| Bemerkungen | | $R_L \rightleftharpoons R_H$ (GTP, GppNHp) | $R_H$ v. $D_1$ ? | $R_L$ v. $D_2$ ? | |

Tab. 2. Charakteristika der Dopaminrezeptoren

anteil (ca. 15%) zur Verfügung steht.- Pharmakologisch unterscheiden sich $D_1$- und $D_2$-Rezeptor sowohl bezüglich ihrer Agonisten- wie Antagonistenspezifität. So sind Apomorphin und Ergot- Derivate volle Agonisten ($K_D$ nanomolar) nur am $D_2$-Rezeptor; Butyrophenone sind sehr viel potentere $D_2$-Antagonisten (s. Tab.2).-

2.1.2.2.1 $D_2$-Rezeptoren in der Hypophyse

In der Hypophyse, speziell im Vorderlappen (HVL) findet sich ausschließlich der $D_2$-Subtyp; deshalb wurde er an diesem Gewebe besonders gut charakterisiert.-
Agonisten hemmen hier die Prolactin- und Alpha-MSH- Ausschüttung. Die Agonisten- und Antagonisten-Affinitäten korrelieren gut mit ihrer Potenz hinsichtlich der Hormonfreisetzung (126,141). Es fand sich eine Klasse von ($^3$H)Spi-Bindungsstellen (Hill-Koeffizient 1, $K_D$ 0,1 nM) (141,142 ). Anders bei der Agonisten-Bindung: die biphasischen Bindungskurven ließen sich am besten durch zwei verschiedene Klassen von Bindungsstellen erklären, die in gleichen Mengen vorhanden sind ($K_H$= 5nM, $K_L$= 350 nM, $n_H$= 0,58).- In Gegenwart von GTP bzw. GppNHp tritt nur noch die niederaffine Klasse auf ($K_L$= 360 nM, $n_H$= 0,94) (52). An intakten Zellen ließ sich die hochaffine Agonistenbindung nicht nachweisen, jedoch an Membranpräparaten davon; man vermutet deshalb Regulation durch GTP in vivo.-
Es fällt die Analogie zum beta-adrenergen System auf (s. Einleitung). Möglicherweise ist auch hier ein GTP_ bindendes N-Protein beteiligt, wobei GTP den Rezeptor-N-Komplex destabilisiert und jener durch Abdissoziation des N-GTP-Komplexes in die niederaffine Agonisten-Konformation überführt wird.- Auch wurden unterschiedliche Rezeptorkomplex-Größen von in Gegenwart bzw. Abwesenheit dopaminerger Agonisten solubilisierten HVL-Homogenaten demonstriert; in Gegenwart von GTP bzw. Antagonisten fand sich mit oder ohne Agonist nur die kleinere Form (143 ). Dies legt ebenfalls die Existenz eines $D_2$-N-Komplexes nahe.- Im Gegensatz zum beta-adrenergen

System ließ sich nie die Stimulierung der Adenylatcyclase nachweisen. Vielmehr wurde nach Agonistengabe das Absinken des cAMP-Spiegels beobachtet (144). Derdirekte Nachweis der Inhibierung der Adenylatcyclase über ein $N_i$-Protein steht aus; dieser Mechanismus gilt jedoch als wahrscheinlich (145).-

2.1.2.2.2 $D_2$-Rezeptoren im Striatum

Im Striatum von Säugerhirn wurden DAR zum ersten Mal 1975 nachgewiesen (146,147). Hier existieren $D_1$- und $D_2$-Rezeptoren nebeneinander.-
Die $K_D$ der ($^3$H)Spi- Bindung beträgt übereinstimmend in Striatum und Hypophyse ca. 0,1 nM. Es existieren hier wie dort nur eine Klasse von Antagonisten-, jedoch zwei Klassen von Agonisten-Bindungsstellen; das Gleichgewicht zwischen ihnen ist GTP-abhängig verschiebbar. Die Konzentration beträgt 25-50 pMol/g Gewebe. Zweiwertige Kationen stimulieren, einwertige inhibieren die Agonistenbindung. - Problematisch ist die ($^3$H)Spi-Kreuzreaktivität mit dem serotoninergen $5HT_2$-Rezeptor. Dieser kann jedoch durch geeignete Konzentrationen des des $5HT_2$-spezifischen Liganden Ketanserin "maskiert" werden ( 148,149,150).- Da die antipsychotische Wirkung der Neuroleptika gut mit Affinität zum $D_2$-Rezeptor korreliert, wird dieser als deren primärer Wirkort angesehen (151, 152). Auch scheint die lindernde Wirkung dopaminerger Agonisten beim Parkinsonismus-Syndrom $D_2$-Rezeptor-vermittelt zu sein (153). Die Existenz mit dem $D_2$-Rezeptor assoziierter N-Proteine gilt als wahrscheinlich (154, 155).- Mittlerweile wurden etliche Versuche zur Solubilisierung von Dopaminrezeptoren unternommen (z.B. 156, 157, 158). Die Ausbeuten liegen zwischen 10 und 40%. Geeignete Detergenzien scheinen Cholsäurederivate zu sein.

2.1.2.3 Weitere Dopaminrezeptor-Typen

Häufig beschrieben wird ein Agonisten hoch-, Butyrophenone aber niederaffin bindender "$D_3$"-Rezeptor (159). Seine

Dichte beträgt 10-40 pMol/g Gewebe. Verdrängungskurven markierter Agonisten durch Spi sind im Striatum daher biphasisch. Die Ionen- und GTP-Abhängigkeit der Agonisten-Bindung läßt sie möglicherweise als die niederaffine Form ($R_L$, s. 2.1.2.2.1) des $D_1$-Typs erscheinen (160). Unter geeigneten Bedingungen ist Agonistenbindung an $D_2$-Rezeptoren ohne $D_3$-Interferenz meßbar (161).- Im Gegensatz zu bisherigen Vermutungen scheinen $D_3$-Rezeptoren keine Autorezeptoren nigrostriataler Endigungen zu sein (160, 162).-
Der als $D_4$ bezeichnete Rezeptor-Typ stellt wahrscheinlich die niederaffine Form ($R_L$) des $D_2$-Rezeptors dar (163, 52). Unsicherheit herrscht auch über die Identität der Benzamid- Bindungsstelle (s.Tab.2). Einige Autoren vermuten in ihr eine Untergruppe von $D_2$-Rezeptoren, da beide Typen in ähnlicher Weise GTP-abhängig bzw. Kainsäure- und OHDA-sensitiv reagieren (52).-

### 2.1.3 Anatomische Lokalisierung zentraler Dopamin-Rezeptoren

Kainsäure-Läsion intrinsischer striataler Neuronen führt zur vollständigen Eliminierung der Dopamin-sensitiven Adenylat-Cyclase; vermutlich sind also $D_1$-Rezeptoren auf diesen Zellen lokalisiert.- Auch die Hälfte der $D_2$-Rezeptoren verschwindet (164, 165). Der Rest scheint auf cortico-striatalen Nervenendigungen lokalisiert zu sein (164).-
Läsion der Substantia nigra durch OHDA bewirkt Veränderung der Verteilung von $D_2$- und $D_3$- Bindung (s.o.); außerdem zerstört dieses Toxin $D_1$-Rezeptoren präsynaptischer Endigungen absteigender Afferenzen (166). $D_2$-Rezeptoren an dopaminergen Zellkörpern wurden auf diese Weise ebenfalls nachgewiesen (167).-
Das Striatum setzt sich aus den Basalganglien Nucleus caudatus und Putamen sowie dem Corpus pallidum zusammen. Die erstgenannten besitzen identische Zellarchitektur

und werden zusammen auch als Neostriatum bezeichnet. Dieses steht anatomisch und funktionell mit der Substantia nigra des Zwischenhirns in Verbindung.-

## 2.2 Ergebnisse

### 2.2.1 Präparation und teilweise Charakterisierung dopaminrezeptorhaltiger Membranen aus Säugerstriatum

Zunächst wurde eine Präparationsmethode hinsichtlich hoher Rezeptorkonzentration und größtmöglicher Homogenität optimiert .

#### 2.2.1.1 Gewebshomogenisation in hypotonem und isotonem Medium

In der Literatur finden sich verschiedene Methoden der Gewebshomogenisierung. Während einige Forschergruppen (Creese, Seeman) im hypotonen Medium mit einem Polytron(146) oder Potter- Homogenisator arbeiten, orientieren sich andere an Synaptosomen-Präparationen in isotoner Sucrose (Laduron, Strange)(168,169). Nachdem die letztere Methode höhere Rezeptorkonzentrationen liefert (169) und außerdem die Membransuspension weniger stark aggregiert, daher für Gleichgewichtsbindungs-Studien geeigneter erscheint, wurde die Gewebsaufarbeitung in 0,32 M Sucrose, 10 mM MOPS, pH 7,4, mittels eines Potter- Homogenisators durchgeführt.- Ausgangsmaterial bildete der Nucleus caudatus aus Rinder- bzw. Schweinehirn.-

#### 2.2.1.2 Vergleich der Rezeptordichte in Rinder- und Schweinestriatum

Hinsichtlich der Dichte hochaffiner ($^3$H)Spi-Bindungsstellen fanden sich nur geringe Unterschiede zwischen beiden Arten:

| Material ( Nucleus caudatus) | hochaffine ($^3$H)Spi- Bindungsstellen (pMol/g Gewebe) | Anzahl der Präparationen |
|---|---|---|
| Rind | 14,8 ± 2,3 | 4 |
| Schwein | 13,5 ± 5,9 | 14 |

Der enscheidende Vorteil besteht in der wesentlich leichteren Gewinnung von großen Mengen Schweinehirn, da Schweine nach der Schlachtung längs halbiert werden. Rinderschädel dagegen bleiben unzerteilt; außerdem werden diese Tiere durch Bolzenschuß in die Schädelmitte getötet, was meist zu unilateraler Zerstörung des Striatums führt.- Bezüglich der Rezeptordichte sind die Literaturangaben wenig verläßlich, da bei Verwendung von ($^3$H)Spi- Konzentrationen über 2nM auch $5HT_2$-Bindungsstellen gesättigt sind und damit die $D_2$-Rezeptordichte um mehr als das Doppelte überschätzt werden kann.-

2.2.1.3 Anreicherung im membrangebundenen Zustand

Das folgende Zentrifugationsschema zeigt den Aufarbeitungsgang für Membranen zum Zweck der größtmöglichen Anreicherung bei nicht zu hohem Materialverlust (Fig.26).

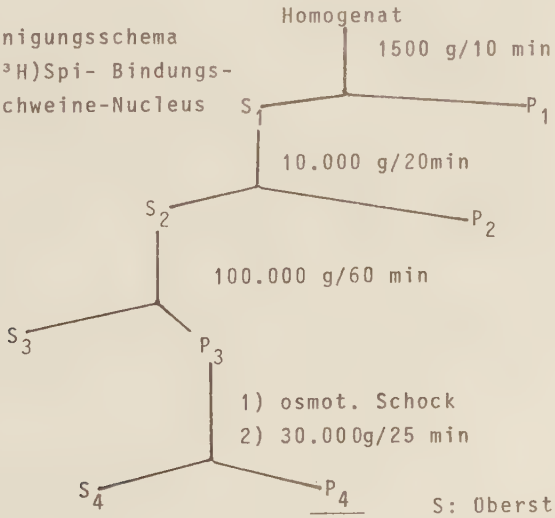



Fig. 26. Reinigungsschema hochaffiner($^3$H)Spi- Bindungsstellenaus Schweine-Nucleus caudatus.

Dieses einfache und schnelle Verfahren liefert eine etwa 3,5-fache Anreicherung hochaffiner ($^3$H)Spi-Rezeptordichte gegenüber dem Rohhomogenat; die Ausbeute beträgt ca. 30% der ursprünglich vorhandenen Bindungsstellen (Tab.3).- Die Gewebsaufarbeitung wird bei niedriger Ionenstärke (low salt) durchgeführt; dies ist bei der Reinigung von membranassoziierten Proteinen (z.B. N-Proteinen) zu berücksichtigen.

2.2.1.4 Einige Bemerkungen

Das Membranpräparat ist, bei -80°C eingefroren, für mindestens zehn Wochen stabil; die Abnahme der Bindungsstellendichte liegt unter 10%.- Sorgfältiger Kontrolle bedarf dagegen die Stabilität des Radioliganden. Aufbewahrung unter $N_2$ und in niedriger Konzentration verlängert die Lebensdauer. Abnahme des spezifischen Bindungsanteils bzw. starke Streuung der Scatchard-Auswertung zeigen den Zerfall des Liganden an.-
Eine weitere Anreicherung von membrangebundenen Rezeptoren ist unter der Bedingung möglich, daß die Membranen des Homogenats sich in ihrer Dichte unterscheiden (s. Reinigung des nAChR). Die ist bei hochaffinen ($^3$H)Spi-Bindungsstellen nicht der Fall: der Großteil fand sich bei eingestelltem Sedimentationsgleichgewicht vergesellschaftet mit der Hauptmenge des Proteins (Fig.27). Die leichte Anreicherung in den oberen Fraktionen ist wegen des geringen Anteils an der Gesamtmenge für präparative Zwecke nicht lohnend.

| | Protein gesamt(mg) | % | ($^3$H)Spi-Bind.stellen fMol/mg | gesamt(pMol) | % | Anreicherungsfaktor |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Rohhomogenat ($S_0$) | 722 | 100 | 139 | 10 | 100 | 1 |
| 1500 g-Sediment ($P_1$) | 164 | 23 | 104 | 1,7 | 17 | 0,74 |
| 1500 g-Überstand ($S_1$) | 553 | 77 | 143 | 7,9 | 79 | 1,05 |
| 10000 g-Sediment ($P_2$) | 331 | 46 | 133 | 4,4 | 44 | 0,96 |
| 10000 g-Überstand ($S_2$) | 220 | 30 | 155 | 3,4 | 34 | 1,13 |
| 100000 g-Sediment ($P_3$) | 96 | 13,3 | 333 | 3,2 | 32 | 2,4 |
| 100000 g-Überstand ($S_3$) | 124 | 17,5 | 1,6 | 0,2 | 2 | 0,2 |
| mot.Sch.-Sediment ($S_4$) | 64 | 8,9 | 484 | 3,1 | 31 | 3,48 |
| " " -Überstand ($P_4$) | 32 | 4,4 | 0 | 0 | 0 | - |
| Wiederauffindungsrate (% des Rohhomogenats) | - | 99 | - | - | 94 | - |

Tab. 3 . Reinigung hochaffiner ($^3$H)Spi- Bindungsstellen aus dem Nucleus caudatus vom Schwein

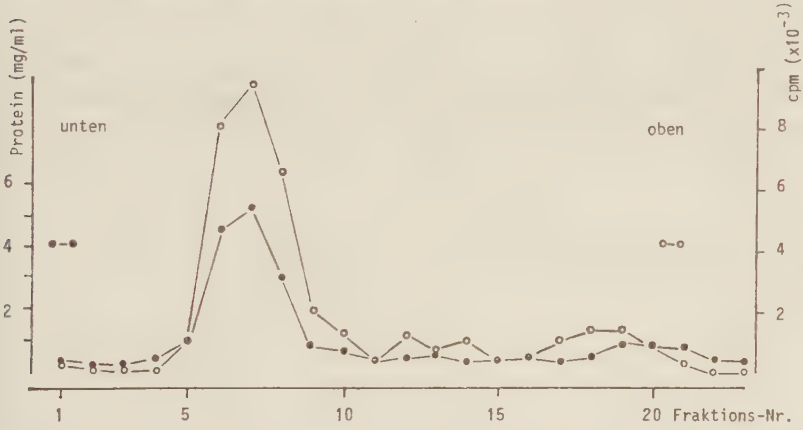



Fig. 27. Sucrosegradientenprofil einer $P_4$- Fraktion aus Schweine-Nucleus caudatus.
5 ml Membransuspension (25 mg Protein) in 0,32 M Sucrose (10,7%), 10 mM MOPS, pH 7,4, wurden auf Sucrosegradienten (25-40%) aufgetragen und für 16 h bei 65,000 g zentrifugiert. Die Fraktionen wurden auf Proteingehalt und ($^3$H)Spi- Bindung untersucht. Die Wiederauffindungsrate von Protein betrug 83%, von Bindungsstellen 75%.

## 2.2.2 ($^3$H)Spiroperidol-Bindungsstudien

### 2.2.2.1 Zeitabhängigkeit der Bindung an Membranen aus Rinder- und Schweine- Nucleus caudatus

Das Bindungsgleichgewicht zwischen ($^3$H)Spi und Rezeptoren ist nach ca. 60 min erreicht (Fig.28A). Die Bindungskinetik folgt nur anfangs der ersten Ordnung (Fig.28B). Da außerdem die Einstellung des Bindungsgleichgewichts lange Zeit beansprucht, stellt sie sicherlich keinen diffusionskontrollierten Prozeß dar. Möglicherweise ist die Zugänglichkeit eines Teils der Rezeptoren, z.B. durch Einschluß in Lipidmembranen, beschränkt.

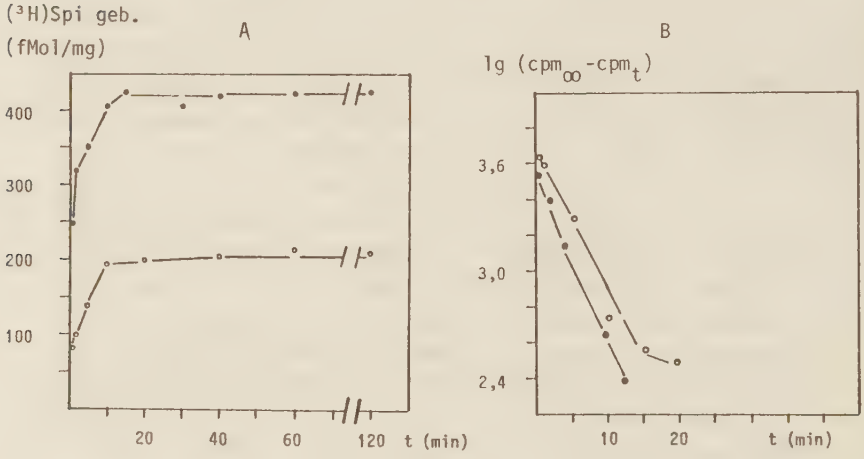



Fig. 28. Zeitabhängigkeit der ($^3$H)Spi-Bindung.-Rezeptormembranen (1 mg/ml Protein) wurden mit 2 nM ($^3$H)Spi für verschiedene Zeiten bei Raumtemp. inkubiert, filtriert, die Filter gewaschen und die zurückgehaltene Radioaktivität bestimmt. Als spezifische Bindung wurde der durch 1 µM (+)Butaclamol verdrängbare Anteil bezeichnet. A: direkte Auftragung; B: logarithmische Auftragung; cpm$_\infty$ : spezifische Bindung nach 120 min. o: Membranen aus Rinderstriatum; •: Membranen aus Schweinestriatum, angereichert (s. Fig. 26, Tab. 3).

### 2.2.2.2 Scatchard- Analyse der Bindungsdaten

Die Auftragung nach Scatchard ermöglicht eine recht genaue Abschätzung der Dissoziationskonstanten des Liganden. Aus der konvexen Krümmung wurde die Existenz zweier Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität gefolgert. Die Verdrängbarkeit eines Teils des gebundenen Liganden durch Ketanserin, einen Antagonisten des $5HT_2$-Rezeptors, bestätigt dies. Der verbleibende Anteil gilt allgemein als $D_2$-spezifisch. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen sind dies ca. 75% der markierten Bindungsstellen.- Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung des $D_2$-spezifischen Anteils besteht im Einsatz dopaminerger Agonisten, z.B. 1mM Dopamin, zur Ermittlung der unspezifischen Bindung, da deren Affinität zum $5HT_2$-Rezeptor niedrig ist. Hierbei ist die Empfindlichkeit des Agonisten gegen Oxidation durch $O_2$ und Monoaminooxidaseaktivität sowie die Abhängigkeit der Agonistenbindung von der Assoziation des Rezeptors mit N-Proteinen zu berücksichtigen.

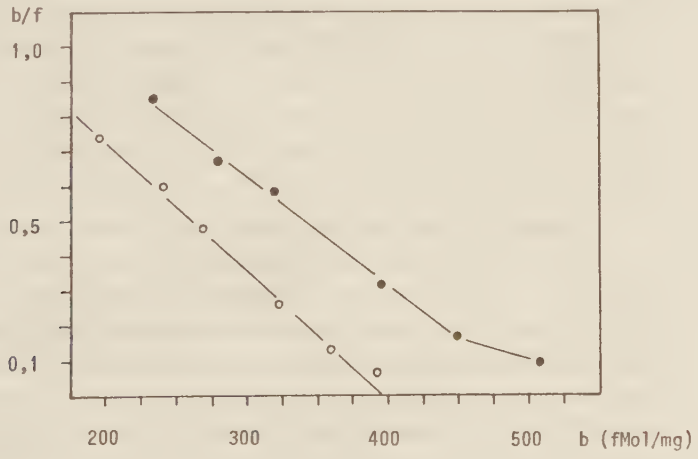



Fig. 29 . Scatchard-Analyse der ($^3$H)Spi-Bindungsdaten.- Membranen aus Schweine-Striatum (1 mg/ml Protein) wurden mit 0,05 bis 1 nM ($^3$H)Spi inkubiert (60 min/Raumtemp.), dann abfiltriert, gewaschen und die zurückgehaltene Radioaktivität gemessen. ● : spez. Bindung ohne Effektor; ,o : spez. Bindung in Gegenwart von 400 nM Ketanserin.

### 2.2.2.3 Untersuchung der Effekte von Kationen und Calmodulin

Die Abhängigkeit der $D_2$-spezifischen Agonistenbindung von Temperatur, Ionenbedingungen, GTP und anderen Effektoren ist ausführlich untersucht worden (52;125,126,150, 161,170,171; s. auch Tab.2). - Dagegen sind keinerlei Modulatoren der Antagonistenbindung beschrieben.
Dies deckt sich mit den vorliegenden Befunden: weder ein-, noch zweiwertige Kationen, noch Calmodulin zeigten innerhalb sinnvoller Konzentrationsbereiche signifikanten Einfluß auf die ($^3$H)Spi-Bindung. Selbst in Gegenwart von 10 mM EGTA präparierte Membranen wiesen hinsichtlich ihrer Rezeptordichte oder -affinität keinerlei Unterschiede auf.-
Im Zusammenhang mit der Untersuchung von Calmodulin-Effekten wurde auch der Calmodulin-Inhibitor Calmidazolium eingesetzt (172). Tatsächlich ließ sich eine starke Inhibierung der ($^3$H)Spi-Bindung an den $D_2$-Rezeptor beobachten; sie war allerdings nicht auf Calmodulin-Blockierung zurückzuführen, da weder EGTA noch das Auswaschen endogenen Calmodulins durch wiederholtes osmotisches Schocken der Membranen irgendwelche Wirkung hatten. Außerdem erfolgt die Inhibierung erst oberhalb von $10^{-5}$ M Calmidazolium (Fig.30 A); die $K_i$ für Calmodulin-vermittelte Prozesse beträgt aber ca. $7 \times 10^{-9}$ M (173).- Die doppelt reziproke Auftragung zeigt ein unklares Bild: kompetitiver und nichtkompetitiver Hemmtyp scheinen zusammenzuwirken (Fig.30 B). Auch verschiedene Phenothiazin-Derivate, z.B. Chlorpromazin und Trifluorperazin, besitzen gleichermaßen calmodulininhibierende und Antagonisten-Aktivität am $D_2$-Rezeptor (s. Tab. 3), binden jedoch mit sehr viel höherer Affinität an letzteren.

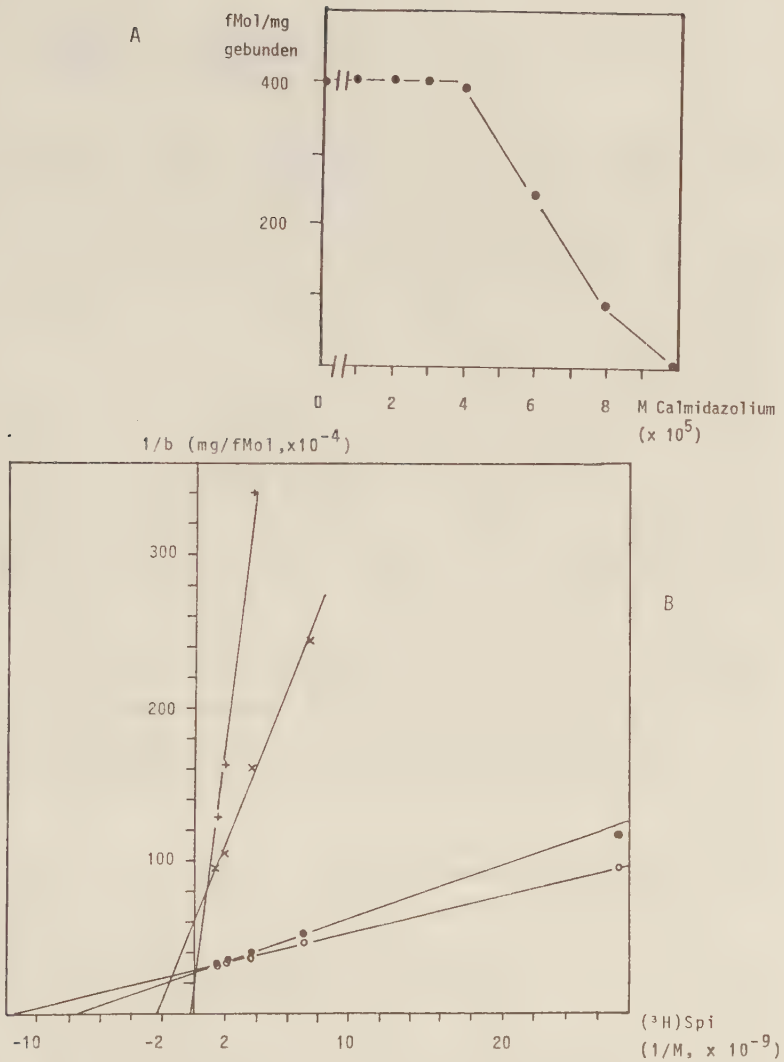



Fig. 30. Inhibierung der ($^3$H)Spi-Bindung an den $D_2$-Rezeptor durch Calmidazolium.- Membranen aus Schweinestriatum (1 mg/ml Protein) wurden mit 0,05 bis 1 nM ($^3$H)Spi inkubiert (60 min, Raumtemp.), abfiltriert und die zurückgehaltene Radioaktivität gemessen .-A: Abhängigkeit der Inhibitionsrate von der Calmidazol-Konzentration; B: Lineweaver-Burk-Auftragung der Bindungsdaten. o: ohne; •: + $4x10^{-5}$ M; x: + $6x10^{-5}$ M; +: + $8x10^{-5}$ M Calmidazolium.

## 2.3 Versuche zur Photomarkierung von Dopamin-Rezeptoren

In Analogie zur Photoaffinitätsmarkierung des nAChR durch Kanalliganden wie ($^3$H)TPMP$^+$, ($^3$H)PCP und anderen Ionenkanalblocker (s. B 1.2) sollte diese Technik zur Identifizierung von Proteinbestandteilen des $D_2$-Rezeptors erprobt werden. Ungünstige Voraussetzungen bilden die geringe Rezeptorkonzentration (380 fMol/mg Membranprotein) und die oftmals hohe Unspezifität dieser Photoreaktionen in ungereinigten Homogenaten (s. B 1.3).
Drei Liganden des $D_2$-Rezeptors wurden ausgewählt: ($^3$H)Chlorpromazin, ($^3$H)Dopamin sowie $^3$H- und $^{125}$J-markiertes Spiroperidol.- Die beiden erstgenannten stellten sich als erwartet photoreaktiv heraus; jedoch besaß die Markierung völlig unspezifischen Charakter, da keinerlei gebundene Radioaktivität durch überschüssigen unmarkierten Liganden verdrängbar war.- Die Ursache hierfür liegt sicherlich zum Teil im sehr hohen unspezifischen Bindungsanteil beider Liganden (über 70%). Im Gegensatz dazu beträgt dieser Anteil bei ($^3$H)Spiroperidol nur ca. 15%. Diese Verbindung erwies sich als deutlich weniger photoreaktiv als die beiden übrigen. Diese Beobachtungen ließen die Hoffnung berechtigt erscheinen, mit ($^{125}$J)Spi hoher spezifischer Aktivität (2200 Ci/mMol) den Photoaffinitätsliganden der Wahl gefunden zu haben. Enttäuschenderweise fanden sich auch in diesem Experiment nur unspezifisch markierte Proteine.- Bindungsstudien zeigten, daß ($^{125}$J)Spi nur geringe Affinität für den $D_2$-Rezeptor besitzt. Hierfür kann nicht Radiolyse der Verbindung verantwortlich gemacht werden, wie dünnschichtchromatographische Analyse von ($^3$H)-, ($^{125}$J)- und unmarkiertem Spiroperidol zeigte.- Die Photomarkierung von Neurorezeptoren durch underivatisierte Liganden scheint in ungereinigten Präparaten nur selten zu gelingen (s. aber (174)).

## 2.4 Nachweis von N-Protein in Membranen aus Schweine-Nucleus caudatus

Die Regulation der Adenylatcyclase-Aktivität erfolgt durch Agonistenbindung an den Rezeptor unter Vermittlung spezifischer GTP-bindender N-Proteine (s.Einleitung).- $D_1$-Rezeptoren stimulieren die Cyclase-Aktivität, $D_2$-Rezeptoren wirken wahrscheinlich inhibierend (s. 2.1.2).- Einen ersten Schritt zur Bestätigung des vermuteten Mechanismus stellt der Nachweis von stimulierenden bzw. inhibitorischen N-Proteinen ($N_s$ bzw. $N_i$) dar.- Mit den Enzymen Cholera- bzw. Pertussis-Toxin stehen zwei Reagenzien zur Verfügung, die $N_s$ bzw. $N_i$ $NAD^+$-abhängig ADP-ribosylieren (59, 60). Diese Reaktionen können bei Verwendung von ($^{32}P$)-$NAD^+$ zur Markierung der Alpha-Untereinheiten der N-Proteine genutzt werden (s. A 1.4.2.2) .- Das Autoradiogramm zeigt in Membranen aus Schweinestriatum und verschiedenen Vergleichs-Zellinien ein durch Pertussistoxin ADP-ribosyliertes Protein von 41 kD; dieses Molekulargewicht stimmt mit dem für $N_i$ beschriebenen überein (59, 60, 61).- Choleratoxin war weniger aktiv; eine schwach markierte Bande vom erwarteten Molekulargewicht (44 kD) ließ sich nur in Striatum-Membranen demonstrieren (Fig. 32).

Fig. 32. ($^{32}P$)ADP-Ribosylierung von N-Proteinen durch Cholera- und Pertussis-Toxin.- Membranen bzw. Zellysate wurden mit 5,4 µCi ($^{32}P$)$NAD^+$ (960 Ci/mMol) und DTT-aktiviertem Toxin 30 min bei 37 °C inkubiert, abzentrifugiert, in Laemmli-Probenpuffer resuspendiert, elektrophoretisiert und autoradiographiert (60 h/-80 °C). Spur 1-3: Striatum-Membranen (80 µg Protein); Spur 4-6: Polymorphkernige Granulocyten (Gesamtzellysat, ca. 8 µg); Spur 7: ($^{14}C$)-markierte Eichproteine; Spur 8-10: basophile Leucocyten (80 µg Protein).- Die jeweils erste Spur zeigt unbehandelte Proben, die zweite mit 20 µg Cholera-Toxin, die dritte mit 2 µg Pertussis-Toxin inkubierte Proben.

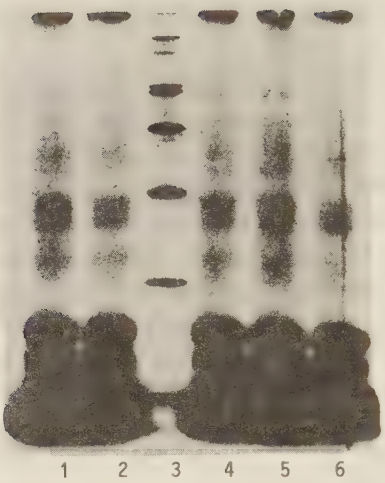



Fig. 31. Photoreaktion von ($^{125}$J)Spi und Membranen aus Schweinestriatum.- Membranen (500 µg Protein, 1 mg/ml) wurden mit 1 nM ($^{125}$J)Spi (1,4 µCi) für 1 h bei Raumtemp. inkubiert, mit 1 ml Puffer gewaschen, in 200 µl Puffer resuspendiert und 5 min UV-bestrahlt. Pro Spur wurden 150 µg Protein aufgetragen und elektrophoretisiert. Das Gel wurde getrocknet und autoradiographiert (5 d,-80°C).- Spur 1: ohne Effektor; Spur 2: + 300 nM Ketanserin; Spur 3: ($^{14}$C)-markierte Eichproteine; Spur 4: + 100 nM unmarkiertes Spi; Spur 5: + 1 µM (+)Butaclamol; Spur 6: + 300 µM Dopamin/$10^{-5}$ M Pargylin.

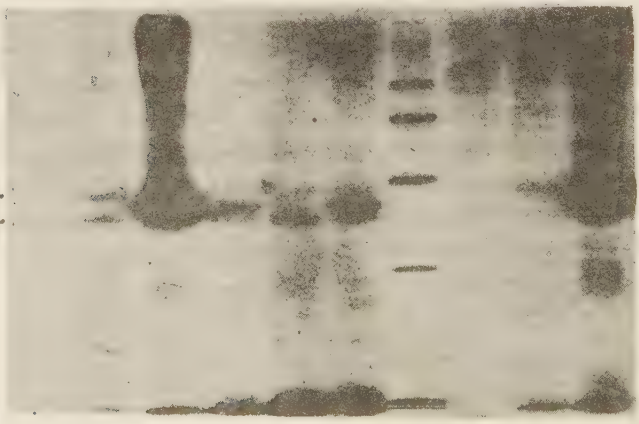



Fig. 32.
Legende s. vorherige Seite.

## 2.5 Ausblick

$D_2$-Rezeptoren vermitteln Signale wahrscheinlich durch Inhibierung der Adenylatcyclase unter Vermittlung inhibitorischer GTP-bindender $N_i$-Proteine.- Zwar ließen sich durch ADP-Ribosylierung mit Pertussis- bzw. Choleratoxin $N_s$ und $N_i$ in Membranen aus Schweinestriatum nachweisen; ein direkter Beweis für die Kopplung zwischen $N_i$ und dem $D_2$-Rezeptor in diesen Membranen fehlt jedoch. Dieser wäre in Anlehnung an ein von Caron und Mitarbeitern an Membranen aus dem Hypophysenvorderlappen des Rinds durchgeführten Experiment denkbar (115): die in An- bzw. Abwesenheit von GTP solubilisierten Rezeptorkomplexe könnten nach Molekulargewichten oder Sedimentationskoeffizienten getrennt werden, wobei der Agonist-stabilisierte Rezeptor-$N_i$-Komplex etwas massereicher sein sollte.

Gereinigte N-Proteine stellen einen potentiellen Affinitätsliganden für eine Vielzahl von Rezeptoren dar; allerdings ist das Problem der Solubilisierung des $D_2$-Rezeptors nicht befriedigend gelöst: die Ausbeute ist gering, die Wechselwirkung von N-Protein und Rezeptor wird durch viele Detergenzien inhibiert.

Schließlich dürften bei der Reinigung von $N_s$ und $N_i$ weitere regulatorische GTP-bindende Proteine gefunden werden, die den Weg zur Aufklärung des Mechanismus' der Signalübertragung durch Proteinkinase C-aktivierende bzw. den Phosphatidylinositolumsatz reglierende Neurorezeptoren ebnen könnten (185).-

## 3 Zusammenfassung

($^3$H)TPMP$^+$, bekannt als 1:1-stöchiometrisch an den nAChR bindender Ionenkanalblocker, ist ein spezifisches Photoaffinitätsreagens für diesen Neurorezeptor. Maximale Ausbeute liefert die Photoreaktion bei einer Wellenlänge von 270 nm; hierbei werden ca. 1 % der Rezeptoren markiert. Befindet sich der nAChR im Ruhezustand, so reagiert der Radioligand bevorzugt mit den Alpha-Untereinheiten. Agonisten und kompetitive Antagonisten, nicht aber BTX, bewirken eine zwei- bis zehnfache Stimulierung der ($^3$H)TPMP$^+$-Inkorporation bei gleichzeitiger Verschiebung der gebundenen Radioaktivität zur Delta- und möglicherweise Beta-Untereinheit des Rezeptors.
Als Ursache hierfür ist eine durch cholinerge Effektoren hervorgerufene Konformationsänderung anzusehen.- Dieser dynamische Vorgang wird nur bei nAChR der Species Torpedo marmorata, nicht aber Torpedo californica beobachtet; dies läßt auf Anregung einer Proteinkomponente, möglicherweise eines aromatischen Aminosäurerestes, als notwendige Voraussetzung für die Stimulierung des Radioaktivitätseinbaus schließen. Diese Proteinkomponente dürfte bei der letztgenannten Species verändert sein.
Die funktionelle Bedeutung der beobachteten Konformationsänderung ist nicht klar; einiges spricht für das Auftreten des desensitivierten Zustandes, der durch Agonisten im Gleichgewicht stabilisiert wird. Da jedoch insbesondere der nicht desensitivierende Antagonist Flaxedil qualitativ ähnliche Effekte bewirkt, ist die Interpretation zumindest für diesen Liganden offen. Flaxedil stabilisiert demnach eine bisher nicht näher beschriebene Rezeptorkonformation, die als antagonistenspezifischer Zustand bezeichnet werden kann.

Der mit ($^3$H)TPMP$^+$ reagierende Teil des Rezeptors befindet sich vermutlich in unmittelbarer Nähe des Ionenkanals, denn 1) existiert nur eine hochaffine Bindungsstelle pro Rezeptormolekül, deren Besetzung zur Blockierung des agonist-stimulierten Ionenflusses führt (28).

2) können Lokalanästhetika, ebenfalls Kanalliganden, ($^3$H)-TPMP$^+$ aus seiner Gleichgewichtsbindungsstelle verdrängen und so die Photomarkierung verhindern.
Die Zeitauflösung der Photoreaktion im physiologisch relevanten Millisekundenmaßstab zeigt je nach Applikationsart des Agonisten Carbamoylcholin unterschiedliche Assoziationskinetiken von ($^3$H)TPMP$^+$ und der Delta-Polypeptidkette des Rezeptors: gleichzeitige Mischung von Carb, Photoligand und Membranen führt zum Anstieg des Radioaktivitätseinbaus mit einer Halbwertszeit von ca. 0,5 sec; unter diesen experimentellen Bedingungen ist mit einem ähnlich schnellen Auftreten des desensitivierten Zustandes zu rechnen.- Voriinkubation mit Carb -der Rezeptor befindet sich im desensitivierten Zustand- bewirkt Zunahme der ($^3$H)TPMP$^+$-Inkorporation auf den gleichen Endwert, jedoch mit zehnfach längerer Halbwertszeit. Die Ursache hierfür ist gegenwärtig unklar.

Die Effekte von Trialkyloxonium-Ionen auf die Ligandenbindung am Acetylcholinrezeptor erwiesen sich trotz einiger Ansätze als schwer zu charakterisieren, da die durch Hydrolyse des Reagenz freigesetzten Protonen und organischen Lösungsmittel unspezifische Membraneffekte verursachen.-

Der $D_2$-Subtyp zentraler Dopaminrezeptoren aus dem Striatum des Schweins wurde in membrangebundenem Zustand 3,5-fach angereichert.- Die biochemische Charakterisierung des Rezeptors war durch Antagonistenbindungsstudien nicht möglich, da deren Assoziation im Gegensatz zur Agonistenbindung nicht reguliert zu werden scheint.- In Analogie zu Literaturdaten wurde die Markierung dopaminerger und serotoninerger ($D_2$- bzw. $5HT_2$-) Rezeptoren durch ($^3$H)Spi verifiziert.
Versuche zur Photomarkierung des $D_2$-Rezeptors gelangen nicht, da die eingesetzten tritiierten Liganden wie auch ($^{125}$J)Spiroperidol hoher spezifischer Aktivität zwar genügend hohe Photoaktivierbarkeit besaßen, jedoch nur unspezifisch reagierten.

Durch ADP-Ribosylierung mit Pertussis- und Choleratoxin ließen sich das die Adenylatcyclase inhibierende GTP-bindende $N_i$ und schwächer das aktivierende $N_s$ in Striatum-Membranen nachweisen. Dies kann als erster Schritt zur Aufklärung des Mechanismus' der Signaltransduktion durch $D_2$-Rezeptoren gelten.

# C Materialien, Geräte, Methoden

## 1 Materialien, Geräte

### Tiere, Gewebe:

| | |
|---|---|
| Torpedo marmorata | aus der Station Biologique d'Arcachon, Frankreich, über Prof. Whittacker, Göttingen |
| Torpedo californica | von Pacific Biomarine, Venice, Kalifornien, USA; tiefgefrorenes elektrisches Gewebe |
| Rinder- und Schweinehirn | vom Schlachthof Berlin-Spandau; Organe wurden ca. 20 min nach Schlachtung der Tiere körperwarm entnommen. |
| Denervierter Rattenmuskel | von den Zentralen Tierlaboratorien der FU, Prof. Juhr |

### Radioaktive Substanzen:

| | |
|---|---|
| ($^{3}$H)Methyltriphenylphosphoniumjodid(($^{3}$H)TPMP$^{+}$)) | ca. 60 Ci/mMol; New England Nuclear, Dreieich |
| ($^{3}$H)Acetylcholinjodid | 50-100 mCi/mMol; w.o. |
| $^{22}$NaCl | 200 µCi/ml; w.o. |
| ($^{125}$J)Bungarotoxin | 20 µCi/µg; w.o. |
| ($^{3}$H)Chlorpromazin | 31,9 Ci/mMol; w.o. |
| ($^{3}$H)Spiroperidol | 22,9 Ci/mMol; w.o. |

| | |
|---|---|
| ($^{125}$J)Spiroperidol | 2200 Ci/mMol; w.o. |
| ($^{32}$P)NAD$^{+}$ | 960 Ci/mMol; w.o. |
| ($^{3}$H)Spiroperidol | 18,6 Ci/mMol; Amersham-Buchler, Braunschweig |
| (7,8-$^{3}$H)Dopamin | 43,8 Ci/mMol; w.o. |
| ($^{14}$C)Methylierte Molekulargewichts-marker-Proteine, | 5 µCi/ml; w.o.<br>bestehend aus:<br>Myosin, 200 kD<br>Phosphorylase B, 92,5 kD<br>Rinder-Serumalbumin, 69 kD<br>Ovalbumin, 46 kD<br>Carboanhydrase, 30 kD<br>Lysozym, 14,3 kD |

Chemikalien:

| | |
|---|---|
| Methyltriphenyl-phosphoniumbromid | Sigma, München |
| MOPS, Tris | w.o. |
| Dopamin | w.o. |
| d-Tubocurarin | w.o. |
| Lidocain | w.o. |
| Dibucain | w.o. |
| Benzocain | w.o. |

| | |
|---|---|
| Tetracain | w.o. |
| Alpha-Bungarotoxin | w.o. |
| Phospholipase $A_2$ (aus Crotalus durissus terrificus-Venom) | w.o. |
| Choleratoxin | w.o. |
| Serva-Blau R | Serva, Heidelberg |
| Polyethylenimin | w.o. |
| SDS | w.o. |
| Triton X-100 | w.o. |
| Calmidazolium | Boehringer, Mannheim |
| Alpha-Bungarotoxin | w.o. |
| Phospholipase $A_2$, Phospholipase D | w.o. |
| Omnifluor, Protosol | New England Nuclear, Dreieich |
| Supertron | Kontron, München |
| Trimethyloxonium-, Trethyloxoniumtetrafluoroborat | Fluka, Neuulm |
| Natriumsalicylat | EGA-Aldrich, Steinheim |
| Ketanserin,Spiroperidol | Geschenke der Fa. Janssen, Neuss |
| (+)Butaclamol | Geschenk von Herrn Dr. Schneider, Schering AG, Berlin |

| | |
|---|---|
| Pertussis-Toxin | Geschenk von Herrn Prof. G. Schultz, Berlin |

Geräte:

| | |
|---|---|
| Elektrophoreseapparatur | SE 600, Hoefer, San Francisco, Kalifornien, USA |
| Netzgerät | Modell 380, ISCO; Lincoln, Nebraska, USA |
| Gradientenprogramm-Pumpe | Modell 380; w.o. |
| Gradientenformer | Auto Densiflow II; Buchler, Fort Lee, New Jersey, USA |
| Flüssigscintillations-zähler | MR 300; Kontron, München |
| Zentrifugen | Kühlzentrifuge Zentrikon H 401; Kontron, München |
| | Ultrazentrifuge TGA-65; w.o. |
| | Kühlzentrifuge RC 5B; Sorvall, Bad Nauheim |
| | Airfuge; Beckman München |
| Rotoren | SW 25; Beckman, München |
| | SS 34; Sorvall, Bad Nauheim |
| | TST 41; Kontron, München |
| | A 8.24; w.o. |

| | |
|---|---|
| Photometer | DMR 11; Zeiss, Oberkochen |
| | PMQ 3; w.o. |
| | MQ 4; w.o. |
| UV-Lampe | Typ 5241, 0,35 Watt; Quarzlampen-GmbH, Hanau |
| Homogenisiergeräte | Commercial Blendor; Waring, New Hartford, Connecticut, USA |
| | Teflon-Homogenisator, Typ S, 60 ml; Braun Melsungen |
| Homogenisiermotor | Typ 85 32 02; Braun Melsungen |
| Ultraschallgerät | Sonorex RK 255 H; Bandelin, Berlin |
| Rundgel-Schneider | Joyce-Löbl Gel Slicer; The Nickle Laboratory Engineering, Gomshall, Surrey,England |
| Fraktionssammler | Microcol TDC 80; Gilson Medical Electronics; Villiers Le Bel, Frankreich |
| Peristaltik-Pumpe | 12000 Varioperpex; LKB, Bromma, Schweden |
| Laser-Densitometer | 2202 Ultroscan; w.o. |
| Hochenergie-Laser | Q-switched Nd:YAG DCR-2A; Quanta Ray, Düsseldorf |
| Stopped Flow- Apparatur | Sigma Instrumente, Berlin |
| Trigger- Verzögerung | Eigenbau |

| | |
|---|---|
| Geltrockner | Modell 224; Hoefer, San Francisco, Kalifornien, USA |
| Autoradiographie-Film | XAR 5; Kodak, Stuttgart |
| Röntgen-Kassette | X-Omatic mit Verstärkerfolie "Regular"; w.o. |
| "Atmosbag" | Sigma, München |
| Filter | EHWP 02500, 0,45 µm-Poren; Millipore, Neu-Isenburg |
| | Selectron BA 85; Schleicher & Schüll, Dassel |
| | GF/B; Whatman, Heidelberg |

## 2. Methoden

### 2.1 Präparation nAChR-reicher Membranen aus Torpedo-Electroplaques

Die Methode ist beschrieben (19).-
Lebende Tiere wurden nach dem Eintreffen getötet, die elektrischen Organe freipräpariert, zerkleinert, in liq. $N_2$ eingefroren und bei -80 °C gelagert.-
Zur Präparation rezeptorreicher Membranen wird das Gewebe aufgetaut und bei 0-4 °C weiterverarbeitet.
60-120 g Gewebe werden nach Abziehen der Haut in zwei Volumina Puffer 1 im Waring-Blendor (Stellung 'high') 3 min homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 27,000 g/90 min wird das Sediment in 1 Volumen Puffer 2 erneut homogenisiert (Stellung 'low'; 3 min) und zentrifugiert (39,000 g/90 min). Der letzte Schritt wird wiederholt.-
Das Sediment besteht aus einer lockeren, oberen Hälfte und einem zähen, unteren Teil; dieser wird verworfen.

Der obere wird in 30 ml Puffer 2 durch eine Kanüle homogenisiert, zentrifugiert (10 min/1000 g) und der Oberstand Auf lineare Sucrose-Gradienten (25-50%) aufgetragen; diese werden 8 h zentrifugiert (SW 25, 22,000 UpM).
Die Gradienten werden in 2 ml-Fraktionen aufgeteilt, die Fraktionen 5-15 vereinigt, auf das fünffache Volumem mit $H_2O$ bidest. verdünnt und zentrifugiert (39,000 g/60 min).
Die Sedimente werden in geeignetem Puffer aufgenommen.
Die spezifische ($^{125}$J)BTX-Bindung beträgt 1500-2000 nMol/g.

| Puffer 1 | Puffer 2 |
|---|---|
| 0,4 M NaCl | 2 mM EDTA |
| 2 mM EDTA | 20 mM Na/$PO_4$, pH 7,4 |
| 20 mM Na/$PO_4$, pH 7,4 | |

## 2.2. Präparation Dopaminrezeptor-haltiger Membranen aus Rinder- bzw. Schweine- Nucleus caudatus

Schweinehirn wird körperwarm in Plastikbeutel verpackt und eiskekühlt transportiert.-
Der Nucleus caudatus ist leicht erkennbar; er wird aus beiden Hemisphären mit dem Skalpell herausgetrennt, in liq. $N_2$ eingefroren und bei -80 °C gelagert.-
Nach dem Auftauen wird das Gewebe bei 0-4 °C weiterverarbeitet. Es wird mit 10 Vol. Puffer 3 im Teflon-Homogenisator (Typ S, 60 ml) durch 20 Züge am Motor bei 1000 UpM homogenisiert, abzentrifugiert (1500 g/10 min), der Überstand erneut homogenisiert (5 Züge/1000 UpM) und abzentrifugiert (10,000 g/20 min). der Überstand wird zentrifugiert (100,000 g/60 min), das Sediment in geringstmöglichem Volumen Puffer 3 resuspendiert (ca.5 ml, Teflon- Homogenisator, 5 Züge), die Suspension wird unter Rühren in das zwanzigfache Volumem $H_2O$ bidest. (eiskalt) gegossen und sofort homogenisiert (5 Züge, 1000 UpM).
Nach Zentrifugation (27,000 g/30 min) wird das Sediment in Puffer3 aufgenommen und in1ml-Aliquots in liq. $N_2$ eingefroren und bei -80 °C gelagert.-

Von entscheidender Bedeutung ist die 'clearance' des Homogenisators; weniger dichte Passung führt zu verändertem Sedimentationsverhalten bei den einzelnen Zentrifugationsschritten (140).

Puffer 3

10 mM MOPS, pH 7,4
0,32 M Sucrose

## 2.3 Bindungsstudien

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde nach der Scatchard-Linearisierung der Michaelis-Menten-Beziehung vorgenommen (148):

$$\frac{(L_B)}{(L_F)} = -\frac{1}{K_D} \cdot (L_B) + \frac{(L_{B,max})}{K_D} \quad ;$$

die Indices bedeuten: B gebunden; F frei; $B_{max}$ maximal gebunden

Im einfachen Fall ergibt sich also eine Gerade der Steigung $-1/K_D$ und dem Achsenabschnitt $L_{B,max}$.
Oft erhält man eine Kurve konvexer oder konkaver Krümmung (s. Fig.29 bzw.23). Der erstgenannte Fall läßt sich als Ergebnis negativer Kooperativität oder-im konkreten Beispiel- Koexistenz zweier Rezeptoren unterschiedlicher Affinität interpretieren. Die zweite Situation wird analog als Ausdruck positiver Kooperativität aufgefasst.

### 2.3.1 ($^3$H)Acetylcholin-Bindung an $TMO^+$/$TEO^+$-modifizierten Rezeptormembranen

Hier ist die Situation durch den Wegfall der unspezifischen Bindung besonders günstig.-
Die Membransuspension in Puffer 4 (ca.100 µg/ml Protein)

wird zur Hemmung der Acetylcholinesterase zunächst mit $10^{-4}$ M Eserin inkubiert (30 min,Raumtemp). Dann folgt Inkubation von je 160 µl Membransuspension mit 50 µl ($^3$H)ACh-Lösung steigender Konzentrationen (5x $10^{-8}$ bis 2x$10^{-7}$ M) für 15 min bei Raumtemp. Dann wird zur Bestimmung der Gesamt-Radioaktivität ein Aliquot (50 µl) abgenommen, der Rest wird zentrifugiert (Airfuge, 15 min, 3 PSI); aus dem Oberstand wird ein weiteres Aliquot (50 µl) zur Bestimmung des freien Radioliganden abgenommen. Alle Proben werden in 5 ml Supertron gezählt und die gebundene Ligandenkonzentration berechnet.-
Zur Modifikation mit $TMO^+$ bzw. $TEO^+$ bzw. deren Hydrolyseprodukten wird eine Membransuspension vor dem Bindungstest (2 mg/ml in Puffer 4, pH 8,3) 30 mM an Reagenz bzw. Hydrolyseprodukten gemacht und nach 2 h bei Raumtemperatur der pH-Wert geprüft; er wird-sofern nötig-auf 7,4 eingestellt.- Dann wird die Suspension verdünnt (ca. 100 µg/ml Protein, s.o.) und der ($^3$H)ACh-Bindungstest wie beschrieben durchgeführt.-

Puffer 4

160 mM NaCl
5 mM KCl
2 mM $MgCl_2$
2 mM $CaCl_2$
3 mM $Na/PO_4$, pH 7,4 bzw. 8,3

2.3.2. ($^3$H)$TPMP^+$-Bindung an $TMO^+$-modifizierten Rezeptormembranen

Die Membranen (0,5 mg/ml Protein) werden mit $10^{-4}$ M Carb inkubiert (5 min, Raumtemp.), mit steigenden Mengen $TMO^+$ bzw. den Hydrolysaten versetzt, 2 h bei Raumtemp. inkubiert, dann der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, die Suspension 1:1 verdünnt und die Proben (je 500 µl) mit 0,5 µM ($^3$H)$TPMP^+$ und 4,5 µM unmarkiertem $TPMP^+$ bzw. zur Bestim-

mung der unspezifischen Bindung mit 5 mM unmmarkiertem $TPMP^+$ inkubiert (30 min, Raumtemp). - Dann werden die Proben abfiltriert (Millipore EHWP 02500, 0,45 µm), dreimal mit je 5 ml Puffer (eiskalt!) gewaschen und die Filter mit je 5 ml Supertron (3 h/Raumtemp.) extrahiert und die Proben gezählt.- Für diese Experimente wird Puffer 4 (s.C2.3.1) verwendet.-

2.3.3. ($^3$H)Spiroperidolbindung an Striatum- Membranen

Die Membranen werden aufgetaut, in Puffer 3 auf 1 mg/ml verdünnt und in 500 µl-Portionen mit 0,05 bis 2 nM ($^3$H)-Spi mit oder ohne 1 µM (+)Butaclamol (Bestimmung der unspezifischen Bindung) versetzt, bis zu 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und die gebundene Radioaktivität durch Filtration über Glasfaser-Filter (Whatman GF/B, 2,5 cm ø) nach 5-maligem Waschen mit eiskalter Lösung 5 und Schütteln der Filter in je 5 ml Supertron (3 h/Raumtemp.) gemessen.- Die Filter werden vor Gebrauch mit 0,2% Polyethylenimin in Lösung 5 gewaschen; hierdurch reduziert sich die unspezifische Bindung des Liganden an den Filter um ca. 50%. Außerdem können mit so behandelten Filtern auch Detergens-solubilisierte Rezeptoren bestimmt werden (149).-

Lösung 5

150 mM NaCl
10 mM MOPS, pH 7,4

2.4 Photomarkierungsexperimente

2.4.1 ($^3$H)$TPMP^+$-Markierung des nAChR von Torpedo im Bindungsgleichgewicht

18 µl Rezeptormembranen (1 mg/ml Protein) werden mit 12 µl 0,3 mM cholinergem Liganden (Carb, Decamethonium, d-Tubocurarin, Flaxedil u.a.) und 6 µl 6 µM ($^3$H)$TPMP^+$ (= 2 µCi)

für 5 min bei Raumtemp. inkubiert, dann bei 4 °C 2 min lang (soweit nicht anders vermerkt) mit einer UV-Lampe bestrahlt; 30 µl-Aliquots werden mit dem gleichen Volumen Puffer 6 versetzt, 30 min bei Raumtemp. inkubiert und über 10%ige SDS-Polyacrylamidgele (179) elektrophoresiert (ca. 18 h, 3,5 mA/const. Strom pro Gel).- Die Gele werden dann fixiert und gefärbt (Lösung 7), entfärbt (Lösung 8), 1 h in 150 ml Lösung 9 pro Gel belassen, getrocknet und mit vorgeblitztem XAR 5 -Film in Röntgenfilmkassetten mit Verstärkerfolien, Typ 'Regular', fluorographiert (ca. 5 d/-80 °C).-

| Puffer 6 | Lösung 7 |
|---|---|
| 2 % SDS | 1 g/l Serva-Blau R |
| 5 % 2-Mercaptoethanol | 10 % Eisessig |
| 10 mM Tris/HCl, pH 6,8 | 30 % Isopropanol |
| 0,005 % Bromphenolblau | 60 % $H_2O$ |
| 10 % Sucrose | |

| Lösung 8 | Lösung 9 |
|---|---|
| 10 % Eisessig | 1 M Na-Salicylat, pH ca. 7 |
| 30 % Methanol | 15 % Ethanol |
| 60 % $H_2O$ | |

Na-Salicylat ist als Fluorophor ebenso effektiv wie PPO/DMSO, jedoch ungiftig, einfach und schnell zu handhaben (178).-

### 2.4.2 Versuch der ($^3$H)TPMP$^+$-Markierung des nAChR aus Rattenmuskel

Eine männliche Vistar-Ratte wird durch Trennung des linken Nervus ischiaticus denerviert.- 14 Tage später wird sie durch $CO_2$-Narkose betäubt, dekapitiert und das linke

Hinterbein entfernt. Dieses wird sofort in liq. $N_2$ eingefroren, zur Präparation aufgetaut, der Unterschenkelmuskel entfernt und in 80 ml Puffer 10 homogenisiert (Waring Blendor, Stellung 'high', 3 min), durch Mull filtriert, zentrifugiert (45 min/80,000 g) und resuspendiert in Puffer 11.- Nun werden 30 µl Suspension (200 µg Protein) mit oder ohne $10^{-4}$ M Carb und 1 µM ($^3$H)TPMP$^+$ (2 µCi) 5 min bei Raumtemp. inkubiert und dann 5 min bei 4 °C bestrahlt. Weiterverfahren wird wie unter C 2.4.1 beschrieben.-

| Puffer 10 | Puffer 11 |
|---|---|
| 1 mM EDTA | wie Puffer 10, |
| 1 mM EGTA | jedoch ohne NaCl |
| 10 µg/ml Sojabohnen-Trypsininhibitor | |
| 1 mM Benzamidin | |
| 100 µg/ml Bacitracin | |
| 0,1 mM PMSF (frisch!) | |
| 400 mM NaCl | |
| 10 mM $Na/PO_4$, pH 7,4 | |

2.4.3 Aufnahme eines Aktionsspektrums der Photoreaktion zwischen ($^3$H)TPMP$^+$ und nAChR

28 µl Torpedo- Membranen (1mg/ml Protein) , 7,5 µl ($^3$H)_ TPMP$^+$ (2,5 µCi) und 15 µl $3x10^{-4}$M Carb werden 5 min bei Raumtemp. inkubiert, in eine 1 ml-Quarzküvette gegeben und in einem MQ 4-Photometer bei offenem Spalt mit monochromatischem Licht verschiedener Wellenlängen aus einer 450 Watt- Xenon-Hochdrucklampe 5 min lang bestrahlt.- Die Suspension wird dann mit dem gleichen Volumen Triton (2%) versetzt, auf DEAE-Filter gegeben, 3 mal mit 30 ml Puffer 12 gewaschen und die gebundene Radioaktivität mit 5 ml Supertron gemessen.-

Puffer 12

0,1 % Triton X-100
50 mM NaCl
10 mM Tris/HCl, pH 7,4

2.4.4 Photomarkierung im Millisekundenmaßstab

Die Bestrahlung der Probe wird in einer eigens für diesen Zweck angefertigten thermoresistenten Mischkammer aus Neusilber durchgeführt, die außerdem die Entnahme der bestrahlten Probe ermöglicht. Die hydrodynamischen Verhältnisse verschlechtern sich dadurch, sodaß die Totzeit der stopped-flow-Apparatur von normalerweise 1ms auf 2,4 ms ansteigt. Die Reaktionskammer hat ein Volumen von 22 µl und eine Lichtweglänge von 5 mm; das gesamte Totvolumen beträgt 8 µl. Die bestrahlte Probe kann durch einen Schlauch am Auslauf der Mischkammer mit einer Hamilton-Spritze abgenommen werden.-
Die Membransuspension und die Effektorenlösung befinden sich in je einer Glasspritze; die Stempel werden durch $N_2$ unter 3,2 bar Druck betrieben. Durch elektronisches Öffnen des Gasventils bewegen sich die Stempel gleichmäßig nach unten wobei insgesamt ca. 300 µl Lösung verbraucht werden.- Der Stop-Schalter löst den Verzögerungsgenerator aus; dieser schaltet den Laser mit oder ohne Verzögerung.- Es wird ein Hochenergie-Laser beim vierfachen der Primärfrequenz (266 nm) verwendet. Die Pulsenergie beträgt ca. 15 mJ, die Pulsdauer 4-5 ns. Der Strahl wird durch eine 300 mm-Quarzlinse fokussiert, sodaß die Reaktionskammer voll ausgeleuchtet ist.-
Die Konzentrationen des Reaktionsansatzes betragen: Protein: 0,5 mg/ml; Carb: $10^{-4}$M; ($^3$H)TPMP$^+$: 0,5 µM; (alle in Puffer 4).-
Die Membranen werden vor der Bestrahlung entweder in nativem Zustand belassen oder mit $10^{-4}$ M Carb bzw. 0,5 µM ($^3$H)TPMP$^+$ vorinkubiert. Die Proben werden weiterverarbeitet wie unter C 2.4.1 beschrieben.-

Aus dem gefärbten Gel werden die Alpha- bzw. Deltabanden ausgeschnitten, in je 10 ml Omnifluor/Toluol/Protosol (12g/1l/3%) 18 h lang geschüttelt und gezählt.-

2.4.5 Versuche zur Photomarkierung des DAR

30 µl Membransuspension (200 µg Protein), 5 µl Radioligand (1-500 nCi) und 5 µl verschiedener Effektoren (alle in Puffer 3) werden 1 h bei Raumtemp. inkubiert, dann 5 min lang bei 4 °C bestrahlt und analysiert wie beschrieben (s. C 2.4.1).- Im Fall von ($^3$H)Dopamin wird die Inkubation und Bestrahlung in Gegenwart von $10^{-5}$ M Pargylin unter $N_2$-Atmosphäre in einem "Atmosbag" vorgenommen.-

2.5 SDS- Elektrophoresen

Sie werden mit 10 %igen Trenngelen und 3 %igen Sammelgelen nach der Laemmli-Methode (179) durchgeführt.-

2.6 Proteinbestimmung

Die Folin-Methode führt bei sehr lipidreichen Geweben zu Trübungen, die durch 1% SDS in Eichstandard und Proben beseitigt werden können.- MOPS interferiert oberhalb von 10 µM.- Im übrigen wird verfahren wie beschrieben (181).-

2.7 Nachweis von Lipase- Aktivität in BTX- Präparaten

Es wird verfahren wie beschrieben (180).-
Eine Kieselgelplatte (Merck) wird bei 120 °C ausgeheizt; Phosphatidylcholin (Sigma; 10 mg/ml) wird in Puffer 4 mit 10 µg BTX bzw. $10^{-3}$ U Lipase $A_2$ (Böhringer) inkubiert (60 min/Raumtemp.), die Proben mit 60 µl $CHCl_3$/Methanol 2:1 extrahiert, zentrifugiert und jeweils 2,5; 5; 10 µl aufgetragen, in $CHCl_3$/Methanol/$H_2O$ 65:25:4 ca. 2,5 h chromatographiert und mit $J_2$-Dampf angefärbt.-

## 2.8 ($^{22}Na^+$)- Efflux aus nAChR-reichen Torpedo-Membranen

Die Methode ist beschrieben (85).-
Membranen (5 mg/ml Protein) werden mit 20 µCi/ml $^{22}NaCl$ inkubiert (12 h/4 °C).- Dann werden 50 µl Membransuspension in 7 ml eiskalten Puffer 13 in Gegenwart oder Abwesenheit von $10^{-5}$ M Carb verdünnt und jede Minute 1ml filtriert (Selectron BA 85), 4 mal mit 5 ml eiskaltem Puffer 13 gewaschen, die Filter in je 10 ml Omnifluor (8g/l)/Dioxan/0,5 ml $H_2O$ geschüttelt (1h) und gezählt.-
Mittlerweile wird statt des Radioisotops 0,4 M LiCl verwendet; die Proben werden flammenemissionsspektrometrisch vermessen.-

Puffer 13

160 mM KCl
5 mM NaCl
2 mM $MgCl_2$
2 mM $CaCl_2$
3 mM $Na/PO_4$, pH 7,0

## 2.9 ADP- Ribosylierung durch Cholera- bzw. Pertussis-Toxin (nach 182).

Die Toxine (ca. 4 mg/ml) werden in 20 mM DTT aktiviert (10 min/37 °C), dann 1:1 in 10 mM TEA, pH 7,4 verdünnt.
Die Reaktionsansätze:
40 µl Membransuspension (1-2 mg/ml Protein)
10 µl Toxin (20 µg CT; 1-10 µg PT)
40 µl Reaktionsgemisch
1-2 µCi ($^{32}P$)$NAD^+$

Die Ansätze werden 30 min bei 37 °C inkubiert, 1 ml TEA, pH 7,4 zugegeben, abzentrifugiert, elektrophoresiert wie unter C 2.4.1 beschrieben und autoradiographiert (ca.48h).-

Reaktionsgemisch

1 mM ATP
1 mM GTP
10 mM Thymidin
10 mM Arginin
5 mM $MgCl_2$
5 mM Creatinphosphat
5 mM Creatinkinase
50 mM TEA/HCl, pH 7,4

# D Literatur


1 Hucho, F. (1982) Einführung in die Neurochemie, Verlag Chemie, Weinheim

2 Lester, H. (1977) Sci. American 236,118-129

3 Wittacker, V.P., Michaelson, I.A., Kirkland, I.J.A. (1964) Biochem. J. 90,293-305

4 Zimmermann, H. (1979) Trends Neurochem. Sci. 2,282-285

5 Massoulié, J., Bon, S. (1982) Ann. Rev. Neurosci. 5,57-106

6 Neubig, R., Krodel, E.K., Boyd, N.D., Cohen, J.B. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 690-694

7 Cuatrecasas, P. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43,169-214

8 Nachmansohn, D, (1959) Chemical&Molecular Basis of Nerve Activity, Academ. Press, New York

9 Changeux, J.P. (1981) Harvey Lect. 75,85-254

10 Barnard, E.A., et al. (1983) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 48,109-124

11 Noda, M. et al. (1983) ebenda, 57-70

12 Hucho, F. (1981) Trends Biochem. Sci. 6,242-244

13 Heidmann, T., Changeux, J.P. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81,1897-1901

14 Hucho, F. Bandini, G., Suarez-Isla, B.A. (1978) Eur. J. Biochem. 83, 335-340

15 Zingsheim, H.P., Neugebauer, D.C., Barrantes, F.J., Frank, J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77,242-244

16 Vandlen, R., Wu, W.L.S., Eisenach, J.C., Raftery, M.A. Biochemistry 18,1845-1854

17 Karlin, A., Cox, R., Kaldany, R.-R., Lobel, P., Holtzmann, E. (1983) Cold Spring Symp. Quant. Biol. 48.1-8

18 Raftery, M.A., Dunn, S., Conti-Tronconi, B.M., Middlemas, D.S., Crawford, R.D. (1983) ebenda, 21-34

19 Schiebler, W., Hucho, F. (1978) Eur. J. Biochem. 85,55-63

20 Epstein, M., Racker, E. (1978) J. Biol. Chem. 253,6660-62

21 Oswald, R.E., Changeux, J.P. (1981) Biochemistry 20,7166-74

22 Oswald, R.E., Changeux, J.P. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78,3925-3929

23 Muhn, P., Hucho, F. (1983) Biochemistry 22, 421-425

24 Albuquerque, E.X, et al. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70,949-953

25 Elliot J., Raftery, M.A. (1979) Biochemistry 18,1868-74

26 Albuquerque, E.X., Tsai, M.C., Aronstam, R.S.,Witkop, B., Eldefrawi, A.T., Eldefrawi, M.E. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1224-1228

27 Eldefrawi, M.E., Eldefrawi, A.T., Aronstam, R.S., Maleque, M.A., Warnick, J.E., Albuquerque, E.X. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77,7458-7462

28 Lauffer, L., Hucho, F. (1982) Proc. Natl. Sci. USA 79, 2406-2409

29 Cohen, J.B., Weber, M., Changeux, J.P. (1983) Mol. Pharmacol. 10,904-932

30 Oswald, R.E., Heidmann, T., Changeux, J.P. (1983) Biochemistry 22,3128-3136

31 Adams, P.R. (1981) J. Membr. Biol. 58, 161-174

32 Neher, E., Steinbach, J.H. (1978) J. Physiol. 277, 153-176

33 Mishina,M. et al. (1984) Nature 307, 604-608

34 Noda, M. et al. (1983) Nature 299, 793-797

35 Finer-Moore, J., Stroud, R.M. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 155-159

36 Weber, M., David-Pfeuty, T., Changeux, J.P. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3443-3447

37 Quast, U., Schimerlik, M., Lee, T., Witzemann, V., Blanchard, S., Raftery, M.A. (1978) Biochemistry 21, 3460-3467

38 Heidmann, T., Changeux, J.P. (1979) Eur. J. Biochem. 74, 255-279, 281-296

39 Boyd, N.D., Cohen, J.B. (1980) Biochemistry 19, 5344-5353

40 Grünhagen, H.-H., Changeux, J.P. (1976) J.Mol. Biol 106, 497-535

41 Eldefrawi, M.E., Aronstam, R.E., Bakry, N., Eldefrawi, A.T., Albuquerque, E.X. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2309-2313

42 Hess, G.P., Cash, D.J., Aoshima, H. (1979) Nature 282, 329-331

43 Neubig,R., Boyd, N., Cohen, J. (1982) Biochemistry 21, 3460-3467

44 Bonner, R., Barrantes, F.J., Jovin, T.M. (1976) Nature 263, 429-431

45 Grünhagen, H.-H., Iwatsubo, M., Changeux, J.P. (1977) Eur. J. Biochem. 80, 225-242

46 Suarez-Isla, B.A., Hucho, F. (1977) FEBS Lett. 75, 65-69

47 Sakmann, B., Patlak, J., Neher, E. (1980) Nature 286, 71-73

48 Neubig, R., Cohen, J.B. (1980) Biochemistry 19, 2770-2779

49 Jackson, M.B. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3607-3611

50 Lauffer, L., Fahr, A., Hucho, F. in Vorbereitung

51 Hoffmann, B.B., Lefkowitz, R.J. (1982) J. Cardiovasc. Pharmacol. 4, 514-518

52 Creese, I., Sibley, D.R., Hamblin, M.W., Leff, S.E. (1983) Ann. Rev. Neurosci. 6,43-71

53 Lefkowitz, R.J., Stadel, J.M., Caron, M.G. (1983) Ann. Rev. Biochem. 52,159-186

54 Rashidbaigi, A., Ruoho, A.E. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. 78,1609-1613

55 Burgermeister, W., Hekman, M., Helmreich, E.J. (1982) J. Biol. Chem. 257,5306-5311

56 Lavin, T.N., Heald, S.L., Jeffs, P.W., Shorr, R.G.L., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1981) J. Biol. Chem. 256,1944-5

57 Vauquelin, G., Geynet, P., Hanoune, J., Strosberg, A.D. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 74,3710-3714

58 Shorr, R.G.L., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1981) J. Biol. Chem. 256,5820-5826

59 Gilman, A. (1984) Cell 36,577

60 Ui, M. (1984) Trends Pharm. Sci. 5,277-279

61 Northup, J., Sternweis, P., Gilman, A. (1983) J. Biol. Chem. 258,11361-11368

62 Lefkowitz, R.J., Mullikin, D., Caron, M.G., (1976) J. Biol. Chem. 251,4686-4691

63 Limbird, L.E., Gill, D.M., Stadel, J.M., Hickey, A.R., Lefkowitz, R.J. (1980) J. Biol. Chem. 255,1854-1861

64 Limbird, L.E., Gill, D.M., Lefkowitz, R.J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77,775-779

65 Cassel, D., Selinger, Z. (1978) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 75,4155-4159

66 Pfeuffer, T. (1977) J. Biol. Chem. 252,7224-7230

67 Awad, J., Johnson,R., Jakobs, K., Schultz, G. (1982) J. Biol. Chem. 258,2960-2965

68 Pfeuffer, T., Metzger, . (1982) FEBS Lett. 146,369-375

69 Seamon, K.B., Daly, J.W. (1981) J. Cycl.Nucl. Res. 7, 201-204

70 Cerione,R.et al. (1984) J. Biol. Chem. 259, 9979-9982

71 Wessels, M.R., Mullikin, D., Lefkowitz, R.J. (1975) Mol. Pharmakol. 16,10-20

72 Harden, T.K., Cotton, L.U., Waldo, G.L., Lutton, J.K. Perkins, J.P. (1980) Science 210 ,441-443

73 Su, Y.F., Harden, T.K., Perkins, J.P. (1980) J. Biol. Chem. 255,7410-7419

74 Stadel, J.M., Nambi, P., Shorr, R., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80,3173-3177

75 Sibley, D.R., Peters, J.R., Nambi, P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1984) J.Biol. Chem. 259,9742-9749

76 Stadel, J.M., Mullikin-Kilpatrick, D., Dukes, D., Lefkowitz, R.J. (1981) J. Cycl. Nucl. Res. 7,37-47

77 Greengard, P. (1976) Nature 260,101-108

78 Kebabian, J.W., Petzold, G.L., Greengard, P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69,2145-2149

79 Cote, T.E., Grewe, C.W., Kebabian, J.W. (1981) Endocrinology 110,805-811

80 Cote, T.E., Frey, E.A., Sekura, R.D. (1984) J. Biol. Chem. 259,8693-8698

81 Stoof, J.C., Kebabian, J.W., (1981) Nature 294, 366-368

82 Duguid, J.R., Raftery, M.A. (1973) Biochemistry 12, 3593-3597

83 Weber, M., Changeux, J.P. (1974) Mol. Pharmacol. 10, 1-40

84 Schiebler, W., Lauffer, L., Hucho, F. (1977) FEBS Lett. 81, 39-42

85 Kasai, M., Changeux, J.P. (1971) J. Membr. Biol. 6, 1-80

86 Koblin, D.K., Lester, H.A. (1979) Mol. Pharmacol. 15, 559-580

87 Andreasen, T.J., McNamee, M.G. (1980) Biochemistry 19, 4719-4726

88 Heidmann,T., Changeux, J.P. (1981) FEBS Lett. 131,239-45

89 Heidmann, T., Oswald, R.E., Changeux, J.P. (1983) Biochemistry 22,3112-3127

90 Sobel, A., Heidmann, T., Cartaud, J., Changeux, J.P. (1980) Eur. J. Biochem. 110,13-33

91 Krodel, E.K., Beckman, R.A., Cohen, J.B. (1979) Mol. Pharmacol. 15,294-312

92 Hellmann, S. (1984) pers. Mitteilung

93 Lauffer, L. (1983) Dissertation, Freie Universität Berlin

94 Lauffer, L. (1982) in: Neuroreceptors, Hrsg. F. Hucho; de Gruyter, Berlin, 289-304

95 Verdenhalven, J. (1984) Dissertation, Freie Universität Berlin

96 Cash, D.H., Hess, G.P. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 842-846

97 Eldefrawi, M.E., Eldefrawi, A.T., Mansour, N.A., Daly, J.W., Witkop, B., Albuquerque, E.A. (1978) Biochemistry 17, 5474-5484

98 Andreasen, T.J., Doerge, D.R., McNamee, M.G. (1979) Arch. Biochem. Biophys. 194, 468-480

99 Bon, C., Changeux, J.P. (1977) Eur. J. Biochem. 74, 31-51

100 Hucho, F. (1984) Funkt. Biol. Med. 3, 179-189

101 Wennogle, L., Oswald, R.E., Saitoh, T., Changeux, J.P. (1981) Biochemistry 20, 2492-2497

102 Sumikawa, K., Barnard, E.A. Dolly, O. (1982) Eur. J. Biochem. 126, 473-479

103 Einarsson, B., Gullick, W., Conti-Tronconi, B., Ellisman, M., Lindstrom, J. (1982) Biochemistry 21,5295-5302

104 Momoi, M.Y., Lennon, V. (1982) J. Biol. Chem. 257,12757-12764

105 Merlie, J.P., Sebbane, R., Gardner, S., Olson,E., Lindstrom, J. (1983) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 48,135-146

106 Axelsson, J., Thesleff, S. (1959) J. Physiol. 147,178-188

107 Miledi, R. (1960) J.Physiol. 151,1-9

108 Brockes, J.P., Hall, Z. (1975) Biochemistry 14,2092-2099

109 Sigworth, F., Spalding, B. (1980) Nature 283,293-295

110 Rawn, D., Lienhard, G. (1974) Biochem. Biophys. Res. Comm. 56,654-660

111 Chao, Y., Vandlen, R., Raftery, M.A. (1975) Biochem. Biophys. Res. Comm. 63,300-307

112 Yonemitsu,D., Hamada, H., Kanaoka,Y. (1969) Tetrahedron Lett. 23,1819-1820

113 Weiland, G., Taylor, P. (1978) Mol. Pharmacol. 15, 197-212

114 Neubig, R., Cohen, J.B. (1979) Biochemistry 18, 5464-5475

115 Shaker, N., Eldefrawi, A.T., Aquayo, L., Warnick, J., Albuquerque, E.X., Eldefrawi, M.E. (1982) J. Pharmacol. Exp. Ther. 220, 172-177

116 Karlin, A., Winnik, M. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 668-674

117 Damle, V.N., Karlin, A. (1980) Biochemistry 19, 3924-3932

118 Muhn, P., Hucho, F. (1984) Biochemistry 23, 2725-2730

119 Schimerlik, M.,Quast, U., Raftery, M.A. (1979) Biochemistry 18, 1884-1890 u. folgende papers

120 Rang, H.P., Ritter,J.M. (1970) Mol. Pharmacol. 6, 357-390

121 Ziskind, L., Dennis, M. (1978) Nature 276, 622-624

122 Trautmann A. (1982) Nature 298, 272-274

123 Kandel, E., Schwartz, J. (1981) Principles in Neural Science, Elsevier/North Holland, New York

124 Titeler, M. (1983) Multiple Dopamine Receptors, Marcel Dekker, New York,Basel

125 Sibley, D., DeLean, A., Creese, I. (1982) J. Biol. Chem. 257,6351-6361

126 Caron, M., Beaulieu, M., Raymond, V., Gagne, B., Drouin, J. Lefkowitz, R.J., Labrie,F. (1978) J. Biol. Chem. 253,2244-2253

127 Hornykiewicz, O. (1966) Metabolism of Brain Dopamine in Human Parkinsonism; in: Hrsg. E. Costa, C.J. Cote, M.D. Yahr: Biochemistry and Pharmacology of the Basal Ganglia, Raven Press, New York, 171-185

128 Ungerstedt, U. (1971) Acta Physiol. Scand. Suppl. 367,69-93

129 Creese, I., Snyder, S.H. (1979) Eur. J. Pharmacol. 56,227-281

130 Snyder, S.H. (1984) Nature 311,514

131 Heikkila, R.E., Manzino, L., Cabbat, F.S., Duvoisin,R.C., (1984) Nature 311,467-469

132 Parsons, B., Rainbow, T., (1984) Eur.J.Pharmacol. 102,375-379

133 Markey, S.P., Johanneson, J.M., Chineh, C.C., Burns, R.S., Kerkenham,M.A. (1984) Nature 311,464-467

134 Lee, T., Seeman, P., Tortellotte, W.W., Farley,I.J., Hornykiewicz, O, (1978) Nature 274,897-900
135 Lee, T., Seeman, P. (1980) Amer. J. Psychiat. 137,191-197
136 Clement-Cormier, Y.C., Kebabian, J.W., Petzold, G.L., Greengard, P. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71,1113-1117
137 Snyder, S.H., Creese, I., Burt, D.R. (1975) Psycho-Pharmacol. Commun. 1,663-673
138 Kebabian, J.W., Calne, D.B. (1979) Nature 277,93-96
139 Weiner, R.J., Ganong, W.F. (1978) Phys. Rev. 58,905-976
140 Cote, T.E., Grewe, C.W., Kebabian, J.W. (1981) Endocrinology 108,420-426
141 Creese, I., Schneider,R.,Snyder, S.H. (1977) Eur. J. Pharmacol. 46,377-381
142 Cronin, M.J., Weiner, R.J. (1979) Endocrinology 104,307-312
143 Kilpatrick, B.F., Caron, M.G. (1983) J. Biol. Chem. 258, 13528-13534
144 DeCamilli, P., Macconi, D.,Spada, A. (1979) Nature 278,252-254
145 Cote, T.E., Grewe, C.W., Tsuruta, K., Stoof, J.C., Eskay, R.L., Kebabian, J.W. (1982) Endocrinology 110,812-819
146 Burt, D.R., Enna, S.J., Creese, I.,Snyder, S,H. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72,4655-4659
147 Seeman, P.,Chan-Wong, M., Tedesco, J., Wong, K. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72,4376-4380
148 Leysen,J.E., Niemegeers, C.J.E., Tollenaere, J.P., Laduron,P.M., (1978) Nature 272, 168-171
149 List, S.J., Seeman, P. (1980) Proc. Natl.Acad. Sci.USA 78,2620-2624
150 Hamblin, M.W., Leff, S.E., Creese, I. (1984) Biochem. Pharmacol. 33,877-887
151 Creese,I., Burt, D.R., Snyder, S.H. (1976) Science 192,481-483
152 Seeman, P., Tedesco, J.L., Lee, M., Chau-Wong, M.,Wong, K. (1976) Nature 261, 717-719
153 Titeler, M., Seeman, P. (1978) Experientia 34, 1490-1492
154 Zahniser, N.R., Molinoff, P.B. (1978) Nature 275, 453-455
155 Hamblin, M., Creese, I. (1982) Mol.Pharmacol. 21,52-56
156 Gorissen, H., Laduron, P.M. (1979) Nature 279,72-74
157 Hall, J.M., Frankham, P.A., Strange, P. (1984) J. Neurochem. 41,1526-1532

158 Lew, J.Y., Goldstein, M. (1984) J.Neurochem. 42,1298-1305
159 Titeler, M., List, S. Seeman, P. (1979) Commun. Psychopharm. 3,411-420
160 Leff, S.E., Creese, I. (1983) Trends Pharm. Sci. 4,463-67
161 Hamblin, M., Creese, I. (1982) Life Sci. 30,1587-95
162 Leff, S.E., Creese, I. (1983) Nature 306,586-589
163 Sokoloff, P., Martres, M.P., Schwartz, J.C. (1980) Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharm. 315,89-102
164 Schwarcz, R., Coyle, J.T. (1977) Life Sci. 20, 431-36
165 Leff, S., Adams, L., Hyttel, J., Creese, I. (1981) Eur. J. Pharmacol. 70,71-75
166 Kebabian, J.W., Saavedra, J.M. (1976) Science 193,685-93
167 Quik, M., Iversen, L.L. (1979) Eur. J. Pharmacol.56, 323-30
168 Henn, S.W., Henn, F.A. (1982) in Handb. Neurochem. 2,147-59
169 Withy, R.M., Mayer, R.J., Strange, P. (1982) J. Neurochem. 38,1348-1355
170 Leysen,J., Gommeren, W. (1981) J. Neurochem. 36,201-19
171 Wreggett,K.A., Seeman, P. (1983) Mol. Pharmacol. 25,10-17
172 van Belle, H. (1981) Cell Calcium 2,483-494
173 van Belle, H. (1984) pers. Mitteilung
174 Graham,D., Pfeiffer, F.,Betz, H. (1981) Biochem. Biophys. Res. Comm. 102,1330-35
175 Wheatly, M., Hall, J., Frankham, P., Strange, P. (1984) J. Neurochem. 43,926-934
176 Scatchard, G., Black, E.S. (1949) J. Phys. Chem. 53,88-93
177 Bruns, R.F., Lawson-Wendling, K., Pugsley, T. (1983) Anal. Biochem. 98,132-135
178 Chamberlain, J.P. (1979) Anal. Biochem. 98,132-135
179 Laemmli, U.K. (1970) Nature 227,680-685
180 Rouser, G., Fleisher, S. (1966) Meth. Enzymol. 10,385-415
181 Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A., Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193,265-275
182 Schultz, G. (1984) pers. Mitteilung
183 Arad, H., Rosenbusch, J., Levitzki, A. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81,6579-6583
184 Nishizuka, Y. (1984) Nature 308,693-698

# E Anhang

## 1 Abkürzungen

| | |
|---|---|
| ACh | Acetylcholin |
| nAChR | nikotinischer Acetylcholinrezeptor |
| BSA | Rinder- Serumalbumin |
| BTX | Alpha- Bungarotoxin |
| cAMP, cGMP | (3',5')cyclisches Adenosinmonophosphat, (3',5')cyclisches Guanosinmonophosphat |
| Carb | Carbamoylcholin |
| cDNA | komplementäre DNA; durch reverse Transkription erhalten |
| Ci, µCi | Curie, Mikrocurie |
| cpm | Impulse pro Minute (counts per minute) |
| CT | Choleratoxin |
| DA | Dopamin |
| DAR | Dopaminrezeptor |
| DEAE | Diethylaminoethyl-; Anionenaustauscher |
| DTT | Dithiothreit |
| EDTA, EGTA | Ethylendiamintetraessigsäure, Ethylenglycoltetraessigsäure |
| g | Erdbeschleunigung (9,81 $Nm/s^2$) |

| | |
|---|---|
| HTX | Histrionicotoxin |
| HVL | Hypophysenvorderlappen |
| HWZ | Halbwertszeit |
| MPTP | N-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin |
| $NAD^+$ | Nicotinsäureamid-Adenindinucleotid |
| PCP | Phencyclidin |
| PT | Pertussistoxin |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| TEA | Triethanolamin |
| $TPMP^+$ | Methyltriphenylphosphonium |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Spi | Spiroperidol |
| UE | Untereinheit (des nAChR) |
| ZNS | Zentralnervensystem |

## E 2 Weitere Experimente

Neben den beschriebenen wurden noch weitere Photomarkierungsexperimente durchgeführt.-
So ließ sich mit ($^3$H)Nicotin (NEN; 50 Ci/mMol) selektiv die Alpha-Untereinheit des nAChR kovalent markieren; Carb war effektiver Kompetitor ($10^{-4}$M).-
($^3$H)PCP reagierte ebenfalls kovalent, jedoch mit ca. 10-fach geringerer Ausbeute als ($^3$H)TPMP. $10^{-4}$ M Carb verdrängte die Radioaktivität aus der Alpha-Untereinheit.-
Versuche zur Markierung des spannungsabhängigen $Na^+$-Kanals in Krebsnervenmembranen mit ($^3$H)$TPMP^+$ gelangen nicht.-

Herrn Prof. Hucho danke ich für seine Geduld, Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn Prof. Schultz danke ich für die Oberlassung von Pertussistoxin und wertvolle Hinweise während der Endphase dieser Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hucho, vor allem bei Iris Pribilla, Hermann Bayer und Jan Verdenhalven, die durch ihre Hilfe und Diskussionsfreudigkeit Impulse gaben.

Herrn Dr. Alfred Fahr gilt mein herzlicher Dank, der durch seinen unermüdlichen Einsatz das Zustandekommen eines wesentlichen Teil dieser Arbeit erst ermöglichte.

Frau B. Hucho danke ich für ihre Hilfe bei Zeichen- und Photoarbeiten.

LEBENSLAUF

Am 10. Oktober 1954 wurde ich als erstes Kind des Arztes Dr. Hans Muhn und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Wendrich, in Nürnberg geboren.
Von 1961 bis 1965 besuchte ich die Volksschule in Schwaig bei Nürnberg, wechselte 1965 an das Willstätter-Gymnasium in Nürnberg und legte dort 1974 die Abiturprüfung ab.

Im Juli 1974 wurde ich zum Wehrdienst eingezogen.-
Im September 1974 begann ich mein Studium, zunächst in der Fachrichtung Chemie an der Universität Erlangen-Nürnberg, seit April 1975 in der Fachrichtung Biochemie an der Freien Universität Berlin. Meine Diplom-Vorprüfung legte ich im September 1977 ab, begann im Juni 1979 meine Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem in den Arbeitsgruppen von Dr. Günther Schütz und Dr. Ruiz-Carrillo und schloß meine Studien im August 1980 mit dem Titel eines Diplom-Biochemikers ab.

Von September 1980 bis September 1981 war ich in der Arbeitsgruppe von Prof. Gräßmann an der FU Berlin tätig.

Im Oktober 1981 begann ich im Labor von Prof. F. Hucho, Freie Universität Berlin, mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen